

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Hiroshi IZUI, et al.

GAU:

SERIAL NO: NEW APPLICATION

EXAMINER:

FILED: HEREWITH

FOR: METHOD FOR PRODUCING L-GLUTAMIC ACID BY FERMENTATION ACCOMPANIED BY
PRECIPITATION

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231



SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Japan	11-234806	August 20, 1999
Japan	2000-78771	March 21, 2000

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

MARVIN J. SPIVAK
REGISTRATION NUMBER 24,913

Norman F. Oblon
Registration No. 24,618



22850

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 8月20日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第234806号

出 願 人

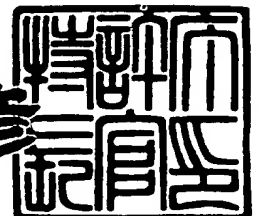
Applicant (s):

味の素株式会社

2000年 3月31日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3022327

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-6375

【提出日】 平成11年 8月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 13/06

【発明の名称】 析出を伴う発酵法によるL-グルタミン酸の製造法

【請求項の数】 11

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵
技術研究所内

【氏名】 泉井 裕

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵
技術研究所内

【氏名】 守屋 美加

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵
技術研究所内

【氏名】 平野 聖子

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵
技術研究所内

【氏名】 原 吉彦

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵
技術研究所内

【氏名】 伊藤 久生

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵

技術研究所内

【氏名】 松井 和彦

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 0 3 - 3 6 6 9 - 6 5 7 1

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 析出を伴う発酵法による L-グルタミン酸の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 特定の pH において飽和濃度の L-グルタミン酸を含む液体培地で生育することができ、かつ、前記 pH の液体培地で L-グルタミン酸の飽和濃度を越える量の L-グルタミン酸を培地中に蓄積する能力を有する微生物。

【請求項 2】 前記 pH が 5. 0 又はそれ以下である請求項 1 記載の微生物。

【請求項 3】 下記の性質の少なくとも一方を有する請求項 1 又は 2 に記載の微生物：

- (a) L-グルタミン酸の生合成反応を触媒する酵素の活性が高められている、
- (b) L-グルタミン酸の生合成経路から分岐して L-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損している。

【請求項 4】 L-グルタミン酸の生合成反応を触媒する酵素が、クエン酸シンターゼ、フォスフォエノールピルベートカルボキシラーゼ、およびグルタミン酸デヒドロゲナーゼから選ばれる請求項 3 記載の微生物。

【請求項 5】 L-グルタミン酸の生合成経路から分岐して L-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素が α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼである請求項 3 又は 4 に記載の微生物。

【請求項 6】 微生物がエンテロバクター属に属することを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の微生物。

【請求項 7】 エンテロバクター・アグロメランスである請求項 6 記載の微生物。

【請求項 8】 糖を含有する培地で培養したときに菌体外に生成する粘液質が野生株よりも少ない変異を有する請求項 7 記載の微生物。

【請求項 9】 請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の微生物を、pH が L-グルタミン酸が析出する条件に調整された液体培地に培養し、該培養液中に L-グルタミン酸を析出させながら生成蓄積させることを特徴とする発酵法による L-グルタミン酸の製造法。

【請求項 1 0】 液体培地中に L-グルタミン酸を析出させながら発酵生産するのに適した微生物をスクリーニングする方法であって、飽和濃度の L-グルタミン酸を含む酸性に調製された培地に微生物を含む試料を接種し、生育する菌株を選抜することを特徴とする方法。

【請求項 1 1】 前記培地の pH が 5. 0 以下である請求項 1 0 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、析出を伴う発酵法による L-グルタミン酸の製造法に関する。L-グルタミン酸は調味料原料等として広く用いられている。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

L-グルタミン酸は、主としてブレバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属に属するいわゆるコリネ型 L-グルタミン酸生産菌またはそれらの変異株を用いた発酵法により製造されている（アミノ酸発酵、学会出版センター、195～215頁、1986年）。その他の菌株を用いた発酵法による L-グルタミン酸の製造法としては、バチルス属、ストレプトミセス属、ペニシリウム属等の微生物を用いる方法（米国特許第 3, 220, 929 号）、シュードモナス属、アースロバクター属、セラチア属、キャンディダ属等の微生物を用いる方法（米国特許第 3, 563, 857 号）、バチルス属、シュードモナス属、セラチア属、アエロバクター・アエロゲネス（現エンテロバクター・アエロゲネス）等の微生物を用いる方法（特公昭 32-9393 号）、エシェリヒア・コリの変異株を用いる方法（特開平 5-244970 号）等が知られている。また、本発明者らは、クレブシエラ属、エルビニア属又はパントテア属に属する微生物を用いた L-グルタミン酸の製造法を提案している（特願平 11-68324 号）。

【0 0 0 3】

また、組換え DNA 技術により L-グルタミン酸の生合成酵素を増強すること

によって、L-グルタミン酸の生産能を増加させる種々の技術が開示されている。例えば、コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属細菌において、エシェリヒア・コリ又はコリネバクテリウム・グルタミクム由来のクエン酸シンターゼをコードする遺伝子の導入が、L-グルタミン酸生産能の増強に効果的であったことが報告されている（特公平 7-1 2 1 2 2 8 号）。また、特開昭 6 1 - 2 6 8 1 8 5 号公報には、コリネバクテリウム属細菌由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を含む組換え体 DNA を保有した細胞が開示されている。さらに、特開昭 6 3 - 2 1 4 1 8 9 号公報には、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子、アコニット酸ヒドラターゼ遺伝子、及びクエン酸シンターゼ遺伝子を増強することによって、L-グルタミン酸の生産能を増加させる技術が開示されている。

【0 0 0 4】

上記のような微生物の育種や製造法の改良により、L-グルタミン酸の生産性はかなり高まってはいるが、今後の需要の一層の増大に応えるためには、さらに安価かつ効率的な L-グルタミン酸の製造法の開発が求められている。

【0 0 0 5】

一方、培養液中に蓄積する L-アミノ酸を晶析せしめながら発酵を行う方法が知られている（特開昭 6 2 - 2 8 8 号）。この方法は、培養液中に蓄積する L-アミノ酸を析出させることにより、培養液中の L-アミノ酸の濃度を一定量以下に維持するというものである。具体的には、L-トリプトファン、L-チロシン又は L-ロイシンは、培養の温度及び pH の調整、又は界面活性剤の培地への添加によって、発酵中に析出する。

【0 0 0 6】

【発明が解決しようとする課題】

上記のように、L-アミノ酸を析出せしめながら発酵を行う方法が知られているが、同方法に好適なアミノ酸は、比較的水溶性の低いアミノ酸であって、L-グルタミン酸のように水溶性の高いアミノ酸に適用した例は知られていない。また、L-グルタミン酸を析出させるためには培地を低 pH にする必要があるが、前記のような L-グルタミン酸生産菌は酸性条件下では生育できず、L-グルタ

ミン酸発酵は中性で行われており（米国特許第3,220,929号、第3,032,474号、K. C. Chao & J.W. Foster, J. Bacteriol., 77, 715-725 (1959)）、析出を伴うL-グルタミン酸の発酵生産は知られていない。さらに、ほとんどの好酸菌の生育が酢酸、乳酸、コハク酸等の有機酸により阻害されることが知られている（大島 泰郎監修「極限環境微生物ハンドブック」第231頁、SCIENCE FORUM; R.M. Borichewski, J. Bacteriol., 93, 597-599 1967)等）。したがって、同じく有機酸であるL-グルタミン酸に対して多くの微生物が酸性条件下で感受性であると考えられ、酸性条件下でL-グルタミン酸生産能を有する微生物の検索自体、試みられたという報告はない。

【0007】

本発明は、上記のような現状に対し、低pH条件下でL-グルタミン酸を生産する微生物を検索、育種し、得られた微生物を用いてL-グルタミン酸を析出させながら発酵生産する方法を提供することを課題とするものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、発酵法によるL-グルタミン酸の生産性向上に関する研究の過程で、培地中に蓄積された高濃度のL-グルタミン酸による生産性の阻害が、生産性向上の障害の一つとなっていると考えた。例えば、微生物細胞はL-グルタミン酸の排出系と取り込み系を有しているが、一旦培地中に排出されたL-グルタミン酸が再び細胞内に取り込まれると、生産効率が低下するばかりでなく、L-グルタミン酸の生合成反応が阻害される結果にもなる。そして、このようなL-アミノ酸の高濃度蓄積による生産性の阻害を回避するために、酸性条件下、かつ、高濃度のL-グルタミン酸存在下で生育できる微生物をスクリーニングしたところ、同性質を有する微生物を土壌から分離することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち本発明は、以下のとおりである。

(1) 特定のpHにおいて飽和濃度のL-グルタミン酸を含む液体培地で生育することができ、かつ、前記pHの液体培地でL-グルタミン酸の飽和濃度を越え

る量の L-グルタミン酸を培地中に蓄積する能力を有する微生物。

(2) 前記 pH が 5.0 又はそれ以下である (1) の微生物。

(3) 下記の性質の少なくとも一方を有する (1) 又は (2) に記載の微生物：

(a) L-グルタミン酸の生合成反応を触媒する酵素の活性が高められている

、 (b) L-グルタミン酸の生合成経路から分岐して L-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損している。

(4) L-グルタミン酸の生合成反応を触媒する酵素が、クエン酸シンターゼ、フォスフォエノールピルベートカルボキシラーゼ、およびグルタミン酸デヒドロゲナーゼから選ばれる (3) の微生物。

(5) L-グルタミン酸の生合成経路から分岐して L-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素が α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼである前記 (3) 又は (4) に記載の微生物。

(6) 微生物がエンテロバクター属に属することを特徴とする (1) ~ (5) のいずれかに記載の微生物。

(7) エンテロバクター・アグロメランスである (6) の微生物。

(8) 糖を含有する培地で培養したときに菌体外に生成する粘液質が、野生株よりも少ない変異を有する (7) の微生物。

【0010】

(9) 前記 (1) ~ (8) のいずれかに記載の微生物を、pH が L-グルタミン酸が析出する条件に調整された液体培地に培養し、該培養液中に L-グルタミン酸を析出させながら生成蓄積させることを特徴とする発酵法による L-グルタミン酸の製造法。

(10) 液体培地中に L-グルタミン酸を析出させながら発酵生産するのに適した微生物をスクリーニングする方法であって、飽和濃度の L-グルタミン酸を含む酸性に調製された培地に微生物を含む試料を接種し、生育する菌株を選抜することを特徴とする方法。

(11) 前記培地の pH が 5.0 以下である (10) の方法。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の微生物は、(1) 特定の pH において飽和濃度の L-グルタミン酸を含む液体培地で生育することができ、かつ、(2) 前記 pH の液体培地で L-グルタミン酸の飽和濃度を越える量の L-グルタミン酸を培地中に蓄積する能力を有する微生物である。

以下に、特定の pH において飽和濃度の L-グルタミン酸を含む液体培地で生育することができる微生物のスクリーニング法を示す。微生物を含む試料を、特定の pH において飽和濃度の L-グルタミン酸を含む液体培地に接種し、生育する菌株を選抜する。特定の pH とは、特に制限されないが、通常、約 5.0 以下、好ましくは約 4.5 以下である。本発明の微生物は L-グルタミン酸を析出させながら発酵生産するのに用いられるものであるが、前記 pH が高すぎると、析出させるのに十分な L-グルタミン酸を微生物に生産させることが困難になる。したがって pH は前記の範囲が好ましい。

L-グルタミン酸を含む水溶液の pH を低下させると、L-グルタミン酸は γ -カルボキシル基の pK_a (4.25、25℃) 付近で溶解度は著しく減少し、等電点 (pH 3.2) で溶解度は最も低くなり、飽和濃度を越える L-グルタミン酸は析出する。培地組成によっても異なるが、L-グルタミン酸は約 30℃ においては、pH 3.2 では 10~20 g/L、pH 4.0 では 30~40 g/L、pH 4.7 では 50~60 g/L 溶解する。尚、pH が一定の値を下回ると L-グルタミン酸を析出させる効果は頭打ちになるので、通常 3.0 以下にする必要はない。しかし、pH が 3.0 以下であっても差し支えない。

【0012】

また、「生育できる」とは、増殖できるか、あるいは増殖しなくても L-グルタミン酸を生産することができることをいう。具体的には、例えば、飽和濃度の L-グルタミン酸を含む pH 5.0~4.0、好ましくは pH 4.5~4.0、さらに好ましくは pH 4.0 の液体合成培地中で、適当な温度、例えば 28℃、37℃又は 50℃にて、2~4 日間培養したときに増殖する微生物は、同培地中で生育できる微生物である。

上記の選抜は、同じ条件で、又は pH もしくは L-グルタミン酸の濃度を変え

て2回又は3回以上繰り返してもよい。また、初期の選抜は、飽和濃度より低い濃度のL-グルタミン酸を含む培地で行い、後の選抜を飽和濃度のL-グルタミン酸を含む培地で行ってもよい。さらに、生育速度に優れる菌株等、好ましい条件を有する菌株を選抜する操作を行ってもよい。

【0013】

本発明の微生物は、上記性質に加えて、液体培地でL-グルタミン酸の飽和濃度を越える量のL-グルタミン酸を培地中に蓄積する能力を有する微生物である。前記液体培地のpHは、前記(1)の性質を有する微生物のスクリーニングに用いた培地のpHと同じか、又はそれに近いpHであることが好ましい。通常、微生物はpHが低くなると高濃度のL-グルタミン酸に対して感受性となるため、L-グルタミン酸に対する耐性という観点からはpHは低くない方が好ましいが、L-グルタミン酸を析出させながら生産させるという観点からは、pHは低い方が好ましい。これらの条件を満足するpH条件としては、3~5、好ましくは4~5、より好ましくは4~4.7、特に好ましくは4~4.5が挙げられる。

【0014】

本発明の微生物又はその育種の材料としては、例えば、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、パントテア (*Pantoea*) 属、エルビニア (*Erwinia*) 属等に属する微生物が挙げられる。これらの中ではエンテロバクター属に属する微生物が好ましい。以下、本発明の微生物について、エンテロバクター属に属する微生物を中心に説明するが、本発明はエンテロバクター属に限られず他の属に属する微生物にも同様に適用され得る。

エンテロバクター属に属する微生物として具体的には、エンテロバクター・アグロメランス (*Enterobacter agglomerans*) が、好ましくはエンテロバクター・アグロメランスAJ13355株が挙げられる。同株は、静岡県磐田市の土壌から、低pHでL-グルタミン酸を含む培地で生育できる株として分離された株である。

【0015】

A J 1 3 3 5 5 の生理的性質を記す。

- (1) グラム染色性：陰性
- (2) 酸素に対する挙動：通性嫌気性
- (3) カタラーゼ：ポジティブ
- (4) オキシダーゼ：ネガティブ
- (5) 硝酸還元能：ネガティブ
- (6) フォゲスープロスカウエル試験：ポジティブ
- (7) メチルレッド試験：ネガティブ
- (8) ウレアーゼ：ネガティブ
- (9) インドール生成：ポジティブ
- (10) 運動性：有り
- (11) T S I 培地での硫化水素生成：微弱な活性あり
- (12) β -ガラクトシダーゼ：ポジティブ

【0 0 1 6】

(13) 糖資化性：

- アラビノース：ポジティブ
- シュクロース：ポジティブ
- ラクトース：ポジティブ
- キシロース：ポジティブ
- ソルビトール：ポジティブ
- イノシトール：ポジティブ
- トレハロース：ポジティブ
- マルトース：ポジティブ
- メリビオース：ポジティブ
- アドニトール：ネガティブ
- ラフィノース：ポジティブ
- サリシン：ネガティブ
- メリビオース：ポジティブ

【0 0 1 7】

(14) グリセロール資化性：ポジティブ

(15) 有機酸資化性：

クエン酸：ポジティブ

酒石酸：ネガティブ

グルコン酸：ポジティブ

酢酸：ポジティブ

マロン酸：ネガティブ

【0018】

(16) アルギニンデヒドラターゼ：ネガティブ

(17) オルチンデカルボキシラーゼ：ネガティブ

(18) リジンデカルボキシラーゼ：ネガティブ

(19) フェニルアラニンデアミナーゼ：ネガティブ

(20) 色素形成 黄色

(21) ゼラチン液化能：ポジティブ

(22) 生育pH pH4生育不良、pH4.5～7生育良好

(23) 生育温度 25℃生育良好、30℃生育良好、37℃生育良好、42℃
生育可、45℃生育不可

【0019】

これらの菌学的性質からA J 1 3 3 5 5はエンテロバクター・アグロメランスと判定された。

エンテロバクター・アグロメランスA J 1 3 3 5 5は、平成10年2月19日に、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号FERM P-16644として寄託されている。

【0020】

本発明の微生物は、元来L-グルタミン酸生産能を有していてもよいし、変異処理又は組換えDNA技術等による育種によってL-グルタミン酸生産能を付与、又は増強されたものであってもよい。

【0021】

L-グルタミン酸生産能は、例えば、L-グルタミン酸の生合成反応を触媒す

る酵素の活性を高めることによって、付与又は増強することができる。また、L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性を低下または欠損させることによって、L-グルタミン酸生産能を増強することができる。

【0022】

L-グルタミン酸の生合成反応を触媒する酵素としては、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ（以下、「GDH」ともいう）、グルタミンシンターゼ、グルタミン酸シンターゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、アコニット酸ヒドラターゼ、クエン酸シンターゼ（以下、「CS」ともいう）、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（以下、「PEPC」ともいう）、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、エノラーゼ、ホスホグリセロムターゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、フルクトースビスリン酸アルドラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコースリン酸イソメラーゼ等が挙げられる。これらの酵素の中では、CS、PEPCおよびGDHのいずれか1種または2種もしくは3種が好ましい。さらに、本発明の微生物においては、CS、PEPCおよびGDHの3種の酵素の活性がともに高められていることが好ましい。特に、ブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタムのCSは、 α -ケトグルタル酸、L-グルタミン酸及びNADHによる阻害を受けないため、好ましいものである。

【0023】

CS、PEPCまたはGDH活性を高めるには、例えば、CS、PEPCまたはGDHをコードする遺伝子を適当なプラスミド上にクローニングし、得られたプラスミドを用いて宿主微生物を形質転換すればよい。形質転換株の細胞内のCS、PEPC及びGDHをコードする遺伝子（以下、おのこのをこの順に「gltA遺伝子」、「ppc遺伝子」、「gdhA遺伝子」と略する）のコピー数が上昇し、その結果CS、PEPC及びGDH活性が高められる。

【0024】

クローニングされたgltA遺伝子、ppc遺伝子、およびgdhA遺伝子は、単独または任意の2種または3種の組合わせで、上記出発親株に導入される。

2種または3種の遺伝子を導入する場合には、一種類のプラスミド上に2種又は3種の遺伝子がクローン化されて宿主に導入されるか、あるいは共存可能な2種類または3種類のプラスミド上に別々にクローン化されて宿主に導入される。

尚、同種の酵素をコードする遺伝子であって、由来が異なる2又は3以上の遺伝子を同一の宿主に導入してもよい。

【0025】

上記プラスミドとしては、例えばエンテロバクター属等に属する微生物の細胞中で自律複製可能なプラスミドであれば特に制限されないが、例えばpUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398、RSF1010、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218、pACYC177、pACYC184等が挙げられる。他にもファージDNAのベクターも利用できる。

【0026】

形質転換は、例えば、D.M.Morrisonの方法 (Methods in Enzymology 68, 326 (1979))、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970))、あるいはエレクトロポレーション法 (Miller J.H., "A Short Course in Bacterial Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A., 1992) 等により行うことができる。

【0027】

CS、PEPCまたはGDH活性を高めることは、gltA遺伝子、ppc遺伝子またはgdhA遺伝子を、宿主となる上記出発親株の染色体DNA上に多コピー存在させることによっても達成できる。エンテロバクター属等に属する微生物の染色体DNA上にgltA遺伝子、ppc遺伝子、またはgdhA遺伝子を多コピーで導入するには、レペッティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーティッド・リピート等、染色体DNA上に多コピー存在する配列が利用できる。あるいは、gltA遺伝子、ppc遺伝子、またはgdhA遺伝子をトランスポゾンに搭載して、これを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。形質転換株の細胞内のgltA遺伝子、ppc遺伝子、またはgdhA遺伝子のコピー数が上昇し、その結果CS、PEPCまたはGDH活性が高められる。

【0028】

コピー数を上昇させる *gltA* 遺伝子、*ppc* 遺伝子、および *gdhA* 遺伝子の供給源となる生物としては、CS、PEPC及びGDH活性を有する生物ならいかなる生物でも良い。なかでも原核生物である細菌、たとえばエンテロバクター属、クレブシエラ属、エルビニア属、パントエア属、セラチア属、エシェリヒア属、コリネバクテリウム属、ブレビバクテリウム属、バチルス属に属する細菌が好ましい。具体的な例としては、エシェリヒア・コリ、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム等が挙げられる。*gltA* 遺伝子、*ppc* 遺伝子、および *gdhA* 遺伝子は、上記のような微生物の染色体DNAより得ることができる。

【0029】

gltA 遺伝子、*ppc* 遺伝子、および *gdhA* 遺伝子は、おのこのCS、PEPCもしくはGDH活性を欠失した変異株を用いてその栄養要求性を相補するDNA断片を上記微生物の染色体DNAから単離することによって取得できる。またエシェリヒア属のこれら遺伝子、コリネバクテリウム属細菌のこれら遺伝子は既に塩基配列が明らかにされていることから (Biochemistry、第22巻、5243～5249頁、1983年; J. Biochem.、第95巻、909～916頁、1984年; Gene、第27巻、193～199頁、1984年; Microbiology、第140巻、1817～1828頁、1994年; Mol. Gen. Genet.、第218巻、330～339頁、1989年; Molecular Microbiology、第6巻、317～326頁、1992年) それぞれの塩基配列に基づいてプライマーを合成し、染色体DNAを鋳型にしてPCR法により取得することが可能である。

【0030】

CS、PEPCまたはGDH活性を高めるには、上記の遺伝子増幅による以外にも、*gltA* 遺伝子、*ppc* 遺伝子、または *gdhA* 遺伝子の発現が強化されることによって達成される。例えば、*gltA* 遺伝子、*ppc* 遺伝子、または *gdhA* 遺伝子のプロモーターをそれよりも強力な他のプロモーターに置換することによって発現が強化される。たとえば、*lac* プロモーター、*trp* プロモーター、*trc* プロモーター、*tac* プロモーター、ラムダファージの P_R プロモ

ーター、 P_L プロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。プロモーターが置換された $gl t A$ 遺伝子、 ppc 遺伝子または $gdh A$ 遺伝子は、プラスミド上にクローニングされて宿主微生物に導入されるか、またはレペッティブDNA、インバーティッド・リピート、またはトランスポゾン等を用いて宿主微生物の染色体DNA上に導入される。

【0031】

また、CS、PEPCまたはGDH活性を高めるには、染色体上の $gl t A$ 遺伝子、 ppc 遺伝子または $gdh A$ 遺伝子のプロモーターを、それらよりも強力なプロモーターで置換する（WO 87/03006号、特開昭61-268183号参照）か、またはそれぞれの遺伝子のコード配列の上流に、強力なプロモーターを挿入すること（Gene, 29, (1984) 231-241参照）によっても達成することができる。具体的には、強力なプロモーターに置換された $gl t A$ 遺伝子、 ppc 遺伝子もしくは $gdh A$ 遺伝子またはそれらの一部を含むDNAと、染色体上の対応する遺伝子との間で相同組換えを起こさせればよい。

【0032】

L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ（以下、「 α KGDH」ともいう）、イソクエン酸リアーゼ、リン酸アセチルトランスフェラーゼ、酢酸キナーゼ、アセトヒドロキシ酸シンターゼ、アセト乳酸シンターゼ、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、1-ピロリンデヒドロゲナーゼ等がある。これらの酵素の中では、 α KGDHが好ましい。

【0033】

エンテロバクター属等に属する微生物において、上記のような酵素の活性を低下または欠損させるには、通常の変異処理法によって、あるいは遺伝子工学的手法によって、上記酵素の遺伝子に、細胞中の当該酵素の活性が低下または欠損するような変異を導入すればよい。

【0034】

変異処理法としては、たとえばX線や紫外線を照射する方法、またはN-メチ

ル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン等の変異剤で処理する方法等がある。遺伝子に変異が導入される部位は、酵素タンパク質をコードするコード領域であってもよく、プロモーター等の発現制御領域であってもよい。

【0035】

また、遺伝子工学的手法には、例えば遺伝子組換え法、形質導入法、細胞融合法等を用いる方法がある。例えば、クローン化された目的遺伝子の内部に薬剤耐性遺伝子を挿入し、機能を失った遺伝子（欠失型遺伝子）を作製する。次いで、この欠失型遺伝子をエンテロバクター属、クレブシエラ属、セラチア属、パントテア属、エルビニア属等に属する微生物の細胞に導入し、相同組み換えを利用して染色体上の目的遺伝子を前記欠失型遺伝子に置換する（遺伝子破壊）。

【0036】

細胞中の目的酵素の活性が低下または欠損していること、および活性の低下の程度は、候補株の菌体抽出液または精製画分の酵素活性を測定し、野生株と比較することによって確認することができる。例えば、 α KGDH活性は、Reedらの方法（L.J.Reed and B.B.Mukherjee, Methods in Enzymology 1969, 13, p.55-61）に従って酵素活性を測定することができる。

【0037】

また、目的とする酵素によっては、変異株の表現型によって目的変異株を選択することができる。例えば、 α KGDH活性が欠損もしくは低下した変異株は、好氣的培養条件ではグルコースを含む最少培地、あるいは、酢酸やL-グルタミン酸を唯一の炭素源として含む最少培地で生育できないか、または生育速度が著しく低下する。ところが、同一条件でもグルコースを含む最少培地にコハク酸またはリジン、メチオニン、及びジアミノピメリン酸を添加することによって通常の生育が可能となる。これらの現象を指標として α KGDH活性が欠損もしくは低下した変異株の選抜が可能である。

【0038】

相同組換えを利用したブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムの α KGDH遺伝子欠損株の作製法は、WO 9 5 / 3 4 6 7 2号に詳述されており、エンテロバクター属、クレブシエラ属、セラチア属、パントテア属、エルビニア属等に

属する微生物にも同様の方法を適用することができる。

【 0 0 3 9 】

その他、遺伝子のクローニング、DNAの切断、連結、形質転換法等の技術については、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989)) 等に詳述されている。

【 0 0 4 0 】

以上のようにして得られる α K G D H活性が欠損もしくは低下した変異株の具体例としては、エンテロバクター・アグロメランス A J 1 3 3 5 6 が挙げられる。エンテロバクター・アグロメランス A J 1 3 3 5 6 は、平成 1 0 年 2 月 1 9 日に、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号 F E R M P - 1 6 6 4 5 として寄託され、平成 1 1 年 1 月 1 1 日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号 F E R M B P - 6 6 1 5 が付与されている。エンテロバクター・アグロメランス A J 1 3 3 5 6 は、 α K G D H - E 1 サブユニット遺伝子 (s u c A) が破壊された結果、 α K G D H 活性を欠損している。

また、本発明に用いられる微生物の一例であるエンテロバクター・アグロメランスは、糖を含有する培地で培養を行うと、菌体外に粘液質を生成するために、操作効率がよくないことがある。したがって、このような粘液質を生成する性質を有するエンテロバクター・アグロメランスを用いる場合には、粘液質の生成量が野生株よりも低下した変異株を用いることが好ましい。変異処理法としては、たとえばX線や紫外線を照射する方法、またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン等の変異剤で処理する方法等がある。また、粘液質の生成量が低下した変異株は、変異処理した菌株を、糖を含む培地、例えば 5 g / L のグルコースを含む L B 培地プレートに撒き、プレートを約 4 5 ° 傾けて培養したときに、液質が流れ落ちないようになったコロニーを選抜することによって選択することができる。

本発明において、L-グルタミン酸生産能の付与又は増強、及び上記の粘液質低生産変異等の好ましい性質の付与は、任意の順序で行うことができる。

【 0 0 4 1 】

本発明の微生物を、p H が L-グルタミン酸が析出する条件に調整された液体

培地に培養することにより、培地中にL-グルタミン酸を析出させながら生成蓄積させることができる。

【0042】

前記培地としては、pHがL-グルタミン酸が析出する条件に調整されること以外は、炭素源、窒素源、無機塩類、その他必要に応じてアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常の栄養培地を用いることができる。合成培地または天然培地のいずれも使用可能である。培地に使用される炭素源および窒素源は、培養する菌株の利用可能なものならばよい。

【0043】

炭素源としてはグルコース、グリセロール、フラクトース、シュクロース、マルトース、マンノース、ガラクトース、でんぷん加水分解物、糖蜜等の糖類が使用され、その他、酢酸、クエン酸等の有機酸等も単独あるいは他の炭素源と併用して用いられる。

【0044】

窒素源としてはアンモニア、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等のアンモニウム塩または硝酸塩等が使用される。

【0045】

有機微量栄養素としては、アミノ酸、ビタミン、脂肪酸、核酸、さらにこれらのものを含有するペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆蛋白分解物等が使用され、生育にアミノ酸等を要求する栄養要求性変異株を使用する場合には要求される栄養素を補添する事が必要である。

【0046】

無機塩類としてはリン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩等が使用される。

培養方法は、発酵温度20ないし42℃、pHを3～5、好ましくは4～5、より好ましくは4～4.7、特に好ましくは4～4.5に制御しつつ通気培養を行う。かくして10時間ないし4日間程度培養することにより培養液中に著量のL-グルタミン酸が蓄積される。蓄積されたL-グルタミン酸のうち、飽和濃度

を越えるものは、培地中に析出する。

【0047】

培養終了後、培養液中に析出したL-グルタミン酸は、遠心分離又は濾過等により採取することができる。また、培地中に溶解しているL-グルタミン酸は、公知の方法に従って採取することができる。例えば、培養液から菌体を除去した後に濃縮晶析する方法、あるいはイオン交換クロマトグラフィー等によって単離することができる。培養液中に析出したL-グルタミン酸は、培地中に溶解しているL-グルタミン酸を晶析した後に、併せて単離してもよい。

【0048】

本発明の方法によれば、飽和濃度を越えるL-グルタミン酸は析出するので、培地中に溶解しているL-グルタミン酸の濃度は一定量に保たれ、微生物が高濃度のL-グルタミン酸から受ける影響を低減することができる。したがって、L-グルタミン酸生産能が一層向上した微生物を育種することも可能となる。また、L-グルタミン酸は結晶として析出してくるため、L-グルタミン酸の蓄積に伴う培養液の酸性化が少なく、培養液のpHを維持するために使用されるアルカリの量が大幅に削減することが可能となる。

【0049】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【0050】

<1>酸性環境下にてL-グルタミン酸耐性を有する微生物の探索

酸性環境下にてL-グルタミン酸耐性を有する微生物の探索は、以下のように行なった。1gの土壌、果実、植物体、河川水などの自然界より得られたサンプルおよそ500点を、それぞれ5mLの滅菌水に懸たくし、そのうち200 μ Lを塩酸にてpHを4.0に調製した固体培地20mLに塗布した。同培地の組成は、以下のとおりである。グルコース3g/L、硫酸アンモニウム1g/L、硫酸マグネシウム7水塩0.2g/L、リン酸2水素カリウム0.5g/L、塩化ナトリウム0.2g/L、塩化カルシウム7水塩0.1g/L、硫酸第一鉄7水塩0.01g/L、硫酸マンガン4水塩0.01g/L、硫酸亜鉛2水塩0.72mg/L、硫酸銅5水塩0.64mg/L、塩化コバルト6水塩0.72mg/L、ホウ酸0.4m

g/L、モリブデン酸ナトリウム 2 水塩 1.2mg/L、ビオチン 50 μ g/L、パントテン酸カルシウム 50 μ g/L、葉酸 50 μ g/L、イノシトール 50 μ g/L、ナイアシン 50 μ g/L、パラアミノ安息香酸 50 μ g/L、ピリドキシン塩酸塩 50 μ g/L、リボフラビン 50 μ g/L、チアミン塩酸塩 50 μ g/L、シクロヘキシミド 50mg/L、寒天 20g/L。

上記のサンプルを塗布した培地を、28℃、37℃又は50℃にて、2～4日間培養し、コロニーを形成する菌株を378株取得した。

【0051】

続いて、上記のようにして得られた菌株を、飽和濃度のL-グルタミン酸を含む液体培地（塩酸にてpH4.0に調整）3mLを注入した長さ16.5cm、径14mmの試験管に植菌し、24時間～3日間、28℃、37℃又は50℃にて振とう培養を行い、増殖する菌株を選抜した。前記培地の組成は、以下のとおりである。グルコース40g/L、硫酸アンモニウム20g/L、硫酸マグネシウム 7 水塩 0.5g/L、リン酸 2 水素カリウム 2g/L、塩化ナトリウム 0.5g/L、塩化カルシウム 7 水塩 0.25g/L、硫酸第一鉄 7 水塩 0.02g/L、硫酸マンガン 4 水塩 0.02g/L、硫酸亜鉛 2 水塩 0.72mg/L、硫酸銅 5 水塩 0.64mg/L、塩化コバルト 6 水塩 0.72mg/L、ホウ酸 0.4mg/L、モリブデン酸ナトリウム 2 水塩 1.2mg/L、酵母エキス 2g/L。

【0052】

このようにして、酸性環境下にてL-グルタミン酸耐性を有する微生物 7 8 株を取得することに成功した。

【0053】

<2>酸性環境下にてL-グルタミン酸耐性を有する微生物からの生育速度に優れた菌株の選抜

上記のようにして得られた、酸性環境下にてL-グルタミン酸耐性を有する種々の微生物を、M9培地（J. Sambrook, E.F.Fritsh, T.Maniatis “Molecular Cloning”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A., 1989）に20g/Lのグルタミン酸と2g/Lのグルコースを加え、pHを塩酸で4.0に調整した培地3mLを注入した長さ16.5cm、径14mmの試験管に植菌し、培地の濁度を経時的に測定することによって、生育速度の良好な菌株の選抜を行った。その結果、生育が良好な菌株として、静岡県磐田市の土壌より採取されたAJ13355株が得られた。本菌株は、

前記の菌学的性質から、エンテロバクター・アグロメランスと判定された。

【0054】

<3>エンテロバクター・アグロメランスAJ13355株からの粘液質低生産株の取得

エンテロバクター・アグロメランスAJ13355株は糖を含有する培地で培養を行うと、菌体外に粘液質を生成するために、操作効率がよくない。そこで、粘液質低生産株の取得を、紫外線照射法 (Miller, J.H. et al., "A Short Course in Bacterial Genetics; Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A., p.150, 1992) により行った。

60Wの紫外線ランプから60cm離れた位置で、エンテロバクター・アグロメランスAJ13355株に紫外線を2分間照射した後、LB培地で終夜培養して変異を固定した。変異処理した菌株を、5g/Lのグルコースと20g/Lの寒天を含むLB培地に、プレート当たり約100個程度のコロニーが出現するように希釈して撒き、プレートを約45°傾けて30℃で終夜培養を行い、粘液質が流れ落ちないようになったコロニーを20個選抜した。

選抜された株の中から、5g/Lのグルコースと20g/Lの寒天を含むLB培地で5回継代培養を行っても復帰変異株が出現せず、さらに、LB培地及び5g/Lのグルコースを含むLB培地ならびにM9培地 (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press, U.S.A. (1989)) に20g/LのL-グルタミン酸と2g/Lのグルコースを加え、pHを塩酸で4.5に調製した培地で親株と同等の生育を示すという条件を満たす菌株として、SC17株を選抜した。

<4>エンテロバクター・アグロメランスSC17株からのグルタミン酸生産菌の構築

(1) エンテロバクター・アグロメランスSC17株からの α KGDH欠損株の作製

エンテロバクター・アグロメランスSC17株から、 α KGDHを欠損し、さらにL-グルタミン酸生合成系が強化された株を作製した。

【0055】

(i) エンテロバクター・アグロメランス A J 1 3 3 5 5 株の α K G D H 遺伝子 (以後「s u c A B」という) のクローニング

エンテロバクター・アグロメランス A J 1 3 3 5 5 株の s u c A B 遺伝子は、エシェリヒア・コリの α K G D H-E 1 サブユニット遺伝子 (以後「s u c A」という) 欠損株の酢酸非資化性を相補する DNA 断片を、エンテロバクター・アグロメランス A J 1 3 3 5 5 株染色体 DNA より選択することによって、クローニングした。

【0056】

エンテロバクター・アグロメランス A J 1 3 3 5 5 株の染色体 DNA は、エシェリヒア・コリにおいて通常染色体 DNA を抽出するのに使用されるのと同様の方法 (生物工学実験書、日本生物工学会編、97-98 頁、培風館、1992 年) で単離した。ベクターとして使用した p T W V 2 2 8 (アンピシリン耐性) は宝酒造社製の市販品を用いた。

【0057】

A J 1 3 3 5 5 株の染色体 DNA を E c o T 2 2 1 で消化したもの、および p T W V 2 2 8 を P s t I で消化したものを T 4 リガーゼにより連結し、s u c A 欠損のエシェリヒア・コリ J R G 4 6 5 株 (Herbert J. ら Mol. Gen. Genetics 1969, 105 巻、182 頁) を形質転換した。こうして得た形質転換株より、酢酸最少培地にて生育する株を選択し、これよりプラスミドを抽出して p T W V E K 1 0 1 と命名した。p T W V E K 1 0 1 を持つエシェリヒア・コリ J R G 4 6 5 株は酢酸非資化性という形質の他にコハク酸もしくは L-リジンおよび L-メチオニンの要求性も回復していた。このことより p T W V E K 1 0 1 にはエンテロバクター・アグロメランスの s u c A 遺伝子が含まれていると考えられる。

【0058】

p T W V E K 1 0 1 のエンテロバクター・アグロメランス由来 DNA 断片の制限酵素地図を図 1 に示した。図 1 の斜線にて示した部分の塩基配列を決定した結果を配列番号 1 に示した。この配列の中には、2 つの完全長の O R F と、2 つの O R F の部分配列と思われる塩基配列が見いだされた。これらの O R F またはそ

の部分配列がコードし得るアミノ酸配列を、5' 側から順に配列番号 2 ~ 5 に示す。これらのホモロジー検索をした結果、塩基配列を決定した部分は、サクシネートデヒドロゲナーゼアイロンスルファープロテイン遺伝子 (s d h B) の 3' 末端側の部分配列、完全長の s u c A と α K G D H - E 2 サブユニット遺伝子 (s u c B 遺伝子)、サクシニル C o A シンセターゼ β サブユニット遺伝子 (s u c C 遺伝子) の 5' 末端側の部分配列を含んでいることが明らかとなった。これらの塩基配列から推定されるアミノ酸配列をそれぞれエシェリヒア・コリのも (Eur.J. Biochem., 141, 351-359 (1984)、Eur.J. Biochem., 141, 361-374 (1984)、Biochemistry, 24, 6245-6252 (1985)) と比較した結果を図 2 ~ 5 に示す。このように各アミノ酸配列は非常に高い相同性を示した。また、エンテロバクター・アグロメランス染色体上でもエシェリヒア・コリと同様に (Eur.J. Biochem., 141, 351-359 (1984)、Eur.J. Biochem., 141, 361-374 (1984)、Biochemistry, 24, 6245-6252 (1985))、s d h B - s u c A - s u c B - s u c C とクラスターを構成していることが判明した。

【 0 0 5 9 】

(ii) エンテロバクター・アグロメランス S C 1 7 株由来の α K G D H 欠損株の取得

上記のようにして取得されたエンテロバクター・アグロメランスの s u c A B 遺伝子を用い、相同組換えによりエンテロバクター・アグロメランスの α K G D H 欠損株の取得を行った。

【 0 0 6 0 】

p T W V E K 1 0 1 を S p h I で切断して s u c A を含む断片を切り出した後、クレノーフラグメント (宝酒造 (株)) で平滑末端化した断片を、E c o R I で切断しクレノーフラグメントで平滑末端化した p B R 3 2 2 (宝酒造 (株)) とを、T 4 D N A リガーゼ (宝酒造 (株)) を用いて結合した。得られたプラスミドを、s u c A のほぼ中央部分に位置する制限酵素 B g l I I 認識部位で同酵素を用いて切断し、クレノーフラグメントで平滑末端化し、再び T 4 D N A リガーゼで結合した。以上の操作によって、新たに構築されたプラスミド中の s u c A にはフレームシフト変異が導入され、同遺伝子は機能しなくなると考えられた

上記のようにして構築されたプラスミドを制限酵素 *Apa* *LI* で切断した後、アガロースゲル電気泳動を行い、フレームシフト変異が導入された *sucA* 及び *pBR322* 由来のテトラサイクリン耐性遺伝子を含む DNA 断片を回収した。回収した DNA 断片を再び *T4* DNA リガーゼで結合し、 α *KGDH* 遺伝子破壊用プラスミドを構築した。

上記のようにして得られた α *KGDH* 遺伝子破壊用プラスミドを用いて、エンテロバクター・アグロメランス SC17 株を、エレクトロポレーション法 (Miller J.H., "A Short Course in Bacterial Genetics; Handbook", Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A., p.279, 1992) によって形質転換し、テトラサイクリン耐性を指標にプラスミドが相同組換えによって染色体上の *sucA* が変異型に置換された菌株を取得した。取得された株を SC17 *sucA* 株を命名した。

SC17 *sucA* 株が α *KGDH* 活性を欠損していることを確認するために、LB 培地で対数増殖期まで培養した同株の菌体を用いて、Reedらの方法 (L.J. Reed and B.B. Mukherjee, *Methods in Enzymology* 1969, 13, p.55-61) に従って酵素活性を測定した。その結果、SC17 株からは 0.073 (Δ *ABS* / min / mgタンパク) の α *KGDH* 活性が検出されたのに対し、SC17 *sucA* 株では α *KGDH* 活性を検出できず、目的通り *sucA* が欠損していることが確かめられた。

【0061】

(2) エンテロバクター・アグロメランス SC17 *sucA* 株の L-グルタミン酸生合成系の強化

続いて SC17 *sucA* 株に、エシェリヒア・コリ由来のクエン酸シンターゼ遺伝子、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子、およびグルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を導入した。

【0062】

(i) エシェリヒア・コリ由来の *gltA* 遺伝子、*ppc* 遺伝子、および *gdhA* 遺伝子を有するプラスミドの作製

gltA遺伝子、ppc遺伝子、およびgdhA遺伝子を有するプラスミドの作成の手順を、図6、7に基づいて説明する。

【0063】

エシェリヒア・コリ由来のgdhA遺伝子を有するプラスミドpBRGDH（特開平7-203980号）をHindIII、SphI消化し、T4DNAポリメラーゼ処理で両末端を平滑末端にした後、gdhA遺伝子を有するDNA断片を精製回収した。一方、エシェリヒア・コリ由来のgltA遺伝子およびppc遺伝子を有するプラスミドpMWCP（WO97/08294号）をXbaIで消化後、T4DNAポリメラーゼで両末端を平滑末端にした。これに、上で精製したgdhA遺伝子を有するDNA断片を混合後、T4リガーゼにより連結し、pMWCPに更にgdhA遺伝子を搭載したプラスミドpMWCPGを得た（図6）。

【0064】

同時に、広宿主域プラスミドRSF1010の複製起点を有するプラスミドpVIC40（特開平8-047397号）をNotIで消化し、T4DNAポリメラーゼ処理した後、PstI消化したものと、pBR322をEcoT141消化し、T4DNAポリメラーゼ処理した後、PstI消化したものとを混合後、T4リガーゼにより連結し、RSF1010の複製起点及びテトラサイクリン耐性遺伝子を有するプラスミドRSF-Tetを得た（図7）。

【0065】

次に、pMWCPGをEcoRI、PstI消化し、gltA遺伝子、ppc遺伝子、およびgdhA遺伝子を有するDNA断片を精製回収し、RSF-Tetを同様にEcoRI、PstI消化し、RSF1010の複製起点を有するDNA断片を精製回収したものと混合後、T4リガーゼにより連結し、RSF-Tet上にgltA遺伝子、ppc遺伝子、およびgdhA遺伝子を搭載したプラスミドRSFCPGを得た（図8）。得られたプラスミドRSFCPGがgltA遺伝子、ppc遺伝子およびgdhA遺伝子を発現していることは、エシェリヒア・コリのgltA遺伝子、ppc遺伝子、あるいはgdhA遺伝子欠損株の栄養要求性の相補と各酵素活性の測定によって確認した。

【0066】

(ii) ブレバクテリウム・ラクトファーマメンタム由来の *gltA* 遺伝子を有するプラスミドの作製

ブレバクテリウム・ラクトファーマメンタム由来の *gltA* 遺伝子を有するプラスミドは、以下のようにして構築した。コリネバクテリウム・グルタミカムの *gltA* 遺伝子の塩基配列 (Microbiology, 1994, 140, 1817-1828) をもとに、配列番号 6 及び 7 に示す塩基配列を有するプライマー DNA を用い、ブレバクテリウム・ラクトファーマメンタム ATCC 13869 の染色体 DNA を鋳型として PCR を行い、約 3 kb の *gltA* 遺伝子断片を得た。この断片を *Sma*I 消化したプラスミド p HSG399 (宝酒造 (株) より購入) に挿入し、プラスミド p HSGCB を得た (図 9)。次に、p HSGCB を *Hind*III で切断し切り出された約 3 kb の *gltA* 遺伝子断片を *Hind*III 消化したプラスミド p STV29 (宝酒造 (株) より購入) に挿入し、プラスミド p STVCB を得た (図 9)。得られたプラスミド p STVCB が *gltA* 遺伝子を発現していることは、エンテロバクター・アグロメランス AJ 13355 株中での酵素活性の測定によって確認した。

【0067】

(iii) RSFCPG 及び p STVCB の SC17sucA 株への導入

エンテロバクター・アグロメランス SC17sucA 株を、RSFCPG を用いてエレクトロポレーション法にて形質転換し、テトラサイクリン耐性を示す形質転換体 SC17sucA/RSFCPG 株を取得した。さらに SC17sucA/RSFCPG 株を p STVCB を用いてエレクトロポレーション法にて形質転換し、クロラムフェニコール耐性を示す形質転換体 SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB 株を取得した。

【0068】

<4> 低 pH 環境下で L-グルタミン酸に対する耐性が向上した菌株の取得

エンテロバクター・アグロメランス SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB 株から、低 pH 環境下で高濃度の L-グルタミン酸に対する耐性が向上した菌株 (以下、「低 pH 下高濃度 Glu 耐性株」ともいう) の分離を行った。

【0069】

SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB株をLBG培地（トリプトン10g/L、酵母エキス5g/L、NaCl 10g/L、グルコース5g/L）にて30℃一夜培養後、生理食塩水にて洗浄した菌体を適宜希釈して、M9-E培地（グルコース4g/L、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 17g/L、 KH_2PO_4 3g/L、NaCl 0.5g/L、 NH_4Cl 1g/L、10mM MgSO_4 、10 μM CaCl_2 、L-リジン 50mg/L、L-メチオニン 50mg/L、DL-ジアミノピメリン酸 50mg/L、テトラサイクリン 25mg/L、クロラムフェニコール 25mg/L、L-グルタミン酸 30g/L、アンモニア水にてpH4.5に調整）プレートに塗布した。32℃、2日間培養後出現したコロニーを低pH下高濃度Glu耐性株として取得した。

【0070】

得られた株について、M9-E液体培地での生育度の測定、及びL-グルタミン酸生産試験管培地（グルコース40g/L、硫酸アンモニウム20g/L、硫酸マグネシウム7水塩0.5g/L、リン酸2水素カリウム2g/L、塩化ナトリウム0.5g/L、塩化カルシウム7水塩0.25g/L、硫酸第一鉄7水塩0.02g/L、硫酸マンガン4水塩0.02g/L、硫酸亜鉛2水塩0.72mg/L、硫酸銅5水塩0.64mg/L、塩化コバルト6水塩0.72mg/L、ホウ酸0.4mg/L、モリブデン酸ナトリウム2水塩1.2mg/L、酵母エキス2g/L、L-リジン塩酸塩200mg/L、L-メチオニン200mg/L、DL- α, ϵ -ジアミノピメリン酸200mg/L、テトラサイクリン塩酸塩25mg/L、クロラムフェニコール25mg/L）5mlを注入した50ml容大型試験管におけるL-グルタミン酸生産能の検定を実施し、生育度が最もよく、L-グルタミン酸生産能が親株SC17/RSFCPG+pSTVCB株と変わらなかった株は、エンテロバクター・アグロメランスAJ13601と命名された。AJ13601株は、1999年8月18日に、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305-8566日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に受託番号FERM P-17516として寄託されている。

【0071】

<5>エンテロバクター・アグロメランスAJ13601株のL-グルタミン酸生産培養

エンテロバクター・アグロメランスAJ13601株を、グルコース40g/L、硫酸アンモニウム20g/L、硫酸マグネシウム7水塩0.5g/L、リン酸2水素カリウム2g/L、塩化ナトリウム0.5g/L、塩化カルシウム7水塩0.25g/L、硫酸第一鉄7水塩0.02g

/L、硫酸マンガン 4 水塩 0.02g/L、硫酸亜鉛 2 水塩 0.72mg/L、硫酸銅 5 水塩 0.64mg/L、塩化コバルト 6 水塩 0.72mg/L、ホウ酸 0.4mg/L、モリブデン酸ナトリウム 2 水塩 1.2mg/L、酵母エキス 2g/L、L-リジン塩酸塩 200mg/L、L-メチオニン 200mg/L、DL- α, ϵ -ジアミノピメリン酸 200mg/L、テトラサイクリン塩酸塩 25mg/L、クロラムフェニコール 25mg/L を含有する培地 300ml を注入した 1L 容のジャーファーマンターに植菌し、34℃、pH6.0 にて 14 時間培養を行った。培養 pH の制御は、培地にアンモニアガスを注入することによって行った。

【0072】

以上のようにして得られた培養液を 5000 回転/分にて 10 分間の遠心分離を行い、集めた菌体をグルコース 40g/L、硫酸アンモニウム 5g/L、硫酸マグネシウム 7 水塩 1.5g/L、リン酸 2 水素カリウム 6g/L、塩化ナトリウム 1.5g/L、塩化カルシウム 7 水塩 0.75g/L、硫酸第一鉄 7 水塩 0.06g/L、硫酸マンガン 4 水塩 0.06g/L、硫酸亜鉛 2 水塩 2.16mg/L、硫酸銅 5 水塩 1.92mg/L、塩化コバルト 6 水塩 2.16mg/L、ホウ酸 1.2mg/L、モリブデン酸ナトリウム 2 水塩 3.6mg/L、酵母エキス 6g/L、L-リジン塩酸塩 600mg/L、L-メチオニン 600mg/L、DL- α, ϵ -ジアミノピメリン酸 600mg/L、テトラサイクリン塩酸塩 25mg/L、クロラムフェニコール 25mg/L を含有する培地 300ml を注入した 1L 容のジャーファーマンターに植菌し、34℃、pH4.5 にて培養を行い、L-グルタミン酸生産培養を行った。培養 pH の制御は、培地にアンモニアガスを注入することによって行った。また、最初に加えたグルコースの枯渇に伴い、600g/L のグルコースを 5mL/時間の速度にて連続的に添加した。

【0073】

以上のようにして L-グルタミン酸生産培養を 50 時間行った結果、ジャーファーマンター内には著量の L-グルタミン酸結晶が析出した。このとき、培養液に溶解している L-グルタミン酸濃度と、結晶を 2 規定の水酸化カリウム溶液にて溶解させることによって測定した L-グルタミン酸濃度を表 1 に示す。尚、L-グルタミン酸の結晶は、培養液を静置し、デカントにより培養液から採取した。

【0074】

【表 1】

表 1

培養液に溶解している L-グルタミン酸濃度	51g/L
結晶として析出した L-グルタミン酸量	67g/L
結晶を溶解させ測定した L-グルタミン酸濃度	118g/L

【 0 0 7 5 】

【発明の効果】

本発明の方法によれば、L-グルタミン酸の析出を伴いながら L-グルタミン酸を発酵生産させることができる。その結果、培地中の L-グルタミン酸は一定濃度以下に保たれ、高濃度の L-グルタミン酸による生産物阻害を受けずに L-グルタミン酸を製造することができる。

【 0 0 7 6 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

- <110> 味の素株式会社 (Ajinomoto Co., Inc.)
- <120> 析出を伴う発酵法による L-グルタミン酸の製造法
- <130> P-6375
- <141> 1999-08-20
- <160> 7
- <170> PatentIn Ver. 2.0

【 0 0 7 7 】

- <210> 1
- <211> 4556
- <212> DNA
- <213> Enterobacter agglomerans

- <220>
- <221> CDS
- <222> (2)..(121)

<220>

<221> CDS

<222> (322)..(3129)

<220>

<221> CDS

<222> (3145)..(4368)

<220>

<221> CDS

<222> (4437)..(4556)

<400> 1

t gca ttc agc gtt ttc cgc tgt cac agc atc atg aac tgt gta agt gtt 49

Ala Phe Ser Val Phe Arg Cys His Ser Ile Met Asn Cys Val Ser Val

1 5 10 15

tgt cct aaa ggg cta aac ccg acg cgc gct atc ggc cac att aag tcg 97

Cys Pro Lys Gly Leu Asn Pro Thr Arg Ala Ile Gly His Ile Lys Ser

20 25 30

atg ctg ctg caa cgc agc gcg tagttatacc accgggaacc tcaggttccc 148

Met Leu Leu Gln Arg Ser Ala

35

ggtatttttac ggaagcctct gtaaagcggg tcccaaccac gtttacaag gttcccttac 208

gggccggggcg cgcgctgcgc acagtgtctg tatcgctgaa ctactacgg caaaccgcga 268

aagcggcaac aaatgaaacc tcaaaaaagc ataacattgc ttaagggatc aca atg 324

Met

1

cag aac agc gcg atg aag ccc tgg ctg gac tcc tcc tgg ctg gcc ggc 372

Gln Asn Ser Ala Met Lys Pro Trp Leu Asp Ser Ser Trp Leu Ala Gly	
5 10 15	
gcg aat cag tct tac ata gag caa ctc tat gag gat ttc ctg acc gat	420
Ala Asn Gln Ser Tyr Ile Glu Gln Leu Tyr Glu Asp Phe Leu Thr Asp	
20 25 30	
cct gac tct gtg gat gca gtg tgg cgc tcg atg ttc caa cag tta cca	468
Pro Asp Ser Val Asp Ala Val Trp Arg Ser Met Phe Gln Gln Leu Pro	
35 40 45	
ggc acg gga gtg aaa cct gag cag ttc cac tcc gca act cgc gaa tat	516
Gly Thr Gly Val Lys Pro Glu Gln Phe His Ser Ala Thr Arg Glu Tyr	
50 55 60 65	
ttc cgt cgc ctg gcg aaa gac gca tct cgt tac acc tcc tca gtt acc	564
Phe Arg Arg Leu Ala Lys Asp Ala Ser Arg Tyr Thr Ser Ser Val Thr	
70 75 80	
gat ccg gca acc aac tcc aaa caa gtg aaa gtg ctg cag ctg att aac	612
Asp Pro Ala Thr Asn Ser Lys Gln Val Lys Val Leu Gln Leu Ile Asn	
85 90 95	
gcg ttt cgt ttc cgc gga cat cag gaa gca aat ctc gat ccg ctt ggc	660
Ala Phe Arg Phe Arg Gly His Gln Glu Ala Asn Leu Asp Pro Leu Gly	
100 105 110	
ctg tgg aaa cag gac cgc gtt gcc gat ctc gat cct gcc ttt cac gat	708
Leu Trp Lys Gln Asp Arg Val Ala Asp Leu Asp Pro Ala Phe His Asp	
115 120 125	
ctg acc gac gcc gat ttt cag gaa agc ttt aac gta ggt tct ttt gcc	756
Leu Thr Asp Ala Asp Phe Gln Glu Ser Phe Asn Val Gly Ser Phe Ala	
130 135 140 145	
att ggc aaa gaa acc atg aag ctg gcc gat ctg ttc gac gcg ctg aag	804
Ile Gly Lys Glu Thr Met Lys Leu Ala Asp Leu Phe Asp Ala Leu Lys	
150 155 160	

cag acc tac tgt ggc tgc att ggt gca gag tat atg cac atc aat aac	852
Gln Thr Tyr Cys Gly Ser Ile Gly Ala Glu Tyr Met His Ile Asn Asn	
165 170 175	
acc gaa gag aaa cgc tgg atc cag cag cgt atc gaa tcc ggt gcg agc	900
Thr Glu Glu Lys Arg Trp Ile Gln Gln Arg Ile Glu Ser Gly Ala Ser	
180 185 190	
cag acg tca ttc agt ggc gaa gag aaa aaa ggt ttc ctg aaa gag ctg	948
Gln Thr Ser Phe Ser Gly Glu Glu Lys Lys Gly Phe Leu Lys Glu Leu	
195 200 205	
acc gcg gca gaa ggg ctg gaa aaa tat ctg ggc gcg aaa ttc ccg ggt	996
Thr Ala Ala Glu Gly Leu Glu Lys Tyr Leu Gly Ala Lys Phe Pro Gly	
210 215 220 225	
gca aaa cgt ttc tgc ctg gaa ggc ggt gat gcg ctg gtg ccg atg ctg	1044
Ala Lys Arg Phe Ser Leu Glu Gly Gly Asp Ala Leu Val Pro Met Leu	
230 235 240	
cgc gag atg att cgt cat gcg ggc aaa agc ggc aca cgt gaa gtg gta	1092
Arg Glu Met Ile Arg His Ala Gly Lys Ser Gly Thr Arg Glu Val Val	
245 250 255	
ctg ggg atg gcg cac cgt ggc cgt ctt aac gta ctg att aac gta ctg	1140
Leu Gly Met Ala His Arg Gly Arg Leu Asn Val Leu Ile Asn Val Leu	
260 265 270	
ggt aaa aag cca cag gat ctg ttc gac gaa ttc tcc ggt aaa cac aaa	1188
Gly Lys Lys Pro Gln Asp Leu Phe Asp Glu Phe Ser Gly Lys His Lys	
275 280 285	
gag cat ctg ggc acc ggt gat gtg aag tat cac atg ggc ttc tct tgc	1236
Glu His Leu Gly Thr Gly Asp Val Lys Tyr His Met Gly Phe Ser Ser	
290 295 300 305	
gat att gaa acc gaa ggt ggt ctg gtg cat ctg gcg ctg gcg ttt aac	1284
Asp Ile Glu Thr Glu Gly Gly Leu Val His Leu Ala Leu Ala Phe Asn	

310	315	320	
ccg tct cac ctg gaa att gtc agc ccg gtg gtc atg gga tcg gta cgt			1332
Pro Ser His Leu Glu Ile Val Ser Pro Val Val Met Gly Ser Val Arg			
325	330	335	
gca cgt ctc gat cgt ctg gcc gaa ccg gtc agc aat aaa gtg ttg cct			1380
Ala Arg Leu Asp Arg Leu Ala Glu Pro Val Ser Asn Lys Val Leu Pro			
340	345	350	
atc acc att cac ggt gat gcg gcg gtg att ggt cag ggc gtg gtt cag			1428
Ile Thr Ile His Gly Asp Ala Ala Val Ile Gly Gln Gly Val Val Gln			
355	360	365	
gaa acc ctg aac atg tct cag gcg cgc ggc tac gaa gtg ggc ggc acg			1476
Glu Thr Leu Asn Met Ser Gln Ala Arg Gly Tyr Glu Val Gly Gly Thr			
370	375	380	385
gta cgt atc gtc att aac aac cag gtt ggt ttt acc acc tcc aac ccg			1524
Val Arg Ile Val Ile Asn Asn Gln Val Gly Phe Thr Thr Ser Asn Pro			
390	395	400	
aaa gat gcg cgt tca acc ccg tac tgt act gac atc ggc aag atg gtg			1572
Lys Asp Ala Arg Ser Thr Pro Tyr Cys Thr Asp Ile Gly Lys Met Val			
405	410	415	
ctg gca ccg att ttc cac gtc aat gct gac gat ccg gaa gcg gtg gcc			1620
Leu Ala Pro Ile Phe His Val Asn Ala Asp Asp Pro Glu Ala Val Ala			
420	425	430	
ttt gtt acc cgc ctg gcg ctg gac tat cgc aac acc ttc aaa cgc gat			1668
Phe Val Thr Arg Leu Ala Leu Asp Tyr Arg Asn Thr Phe Lys Arg Asp			
435	440	445	
gtg ttt atc gat ctg gtg tgc tat cgc cgt cat ggt cac aac gag gcg			1716
Val Phe Ile Asp Leu Val Cys Tyr Arg Arg His Gly His Asn Glu Ala			
450	455	460	465
gat gag cca agt gct acc cag ccg ttg atg tac cag aaa atc aaa aag			1764

Asp Glu Pro Ser Ala Thr Gln Pro Leu Met Tyr Gln Lys Ile Lys Lys	
470 475 480	
cat ccg acg ccg cgt aaa att tac gcc gat cgt ctg gaa ggc gaa ggt	1812
His Pro Thr Pro Arg Lys Ile Tyr Ala Asp Arg Leu Glu Gly Glu Gly	
485 490 495	
gtc gcg tcg cag gaa gat gcc acc gag atg gtg aac ctg tac cgc gat	1860
Val Ala Ser Gln Glu Asp Ala Thr Glu Met Val Asn Leu Tyr Arg Asp	
500 505 510	
gcg ctc gat gcg ggc gaa tgc gtg gtg ccg gaa tgg cgt ccg atg agc	1908
Ala Leu Asp Ala Gly Glu Cys Val Val Pro Glu Trp Arg Pro Met Ser	
515 520 525	
ctg cac tcc ttc acg tgg tcg cct tat ctg aac cac gaa tgg gat gag	1956
Leu His Ser Phe Thr Trp Ser Pro Tyr Leu Asn His Glu Trp Asp Glu	
530 535 540 545	
cct tat ccg gca cag gtt gac atg aaa cgc ctg aag gaa ctg gca ttg	2004
Pro Tyr Pro Ala Gln Val Asp Met Lys Arg Leu Lys Glu Leu Ala Leu	
550 555 560	
cgt atc agc cag gtc cct gag cag att gaa gtg cag tcg cgc gtg gcc	2052
Arg Ile Ser Gln Val Pro Glu Gln Ile Glu Val Gln Ser Arg Val Ala	
565 570 575	
aag atc tat aac gat cgc aag ctg atg gcc gaa ggc gag aaa gcg ttc	2100
Lys Ile Tyr Asn Asp Arg Lys Leu Met Ala Glu Gly Glu Lys Ala Phe	
580 585 590	
gac tgg ggc ggt gcc gag aat ctg gcg tac gcc acg ctg gtg gat gaa	2148
Asp Trp Gly Gly Ala Glu Asn Leu Ala Tyr Ala Thr Leu Val Asp Glu	
595 600 605	
ggg att ccg gtt cgc ctc tcg ggt gaa gac tcc ggt cgt gga acc ttc	2196
Gly Ile Pro Val Arg Leu Ser Gly Glu Asp Ser Gly Arg Gly Thr Phe	
610 615 620 625	

ttc cat cgc cac gcg gtc gtg cac aac cag gct aac ggt tca acc tat	2244
Phe His Arg His Ala Val Val His Asn Gln Ala Asn Gly Ser Thr Tyr	
630 635 640	
acg ccg ctg cac cat att cat aac agc cag ggc gag ttc aaa gtc tgg	2292
Thr Pro Leu His His Ile His Asn Ser Gln Gly Glu Phe Lys Val Trp	
645 650 655	
gat tcg gtg ctg tct gaa gaa gcg gtg ctg gcg ttt gaa tac ggt tac	2340
Asp Ser Val Leu Ser Glu Glu Ala Val Leu Ala Phe Glu Tyr Gly Tyr	
660 665 670	
gcc acg gct gag ccg cgc gtg ctg acc atc tgg gaa gcg cag ttt ggt	2388
Ala Thr Ala Glu Pro Arg Val Leu Thr Ile Trp Glu Ala Gln Phe Gly	
675 680 685	
gac ttt gcc aac ggt gct cag gtg gtg att gac cag ttc atc agc tct	2436
Asp Phe Ala Asn Gly Ala Gln Val Val Ile Asp Gln Phe Ile Ser Ser	
690 695 700 705	
ggc gaa cag aag tgg ggc cgt atg tgt ggc ctg gtg atg ttg ctg ccg	2484
Gly Glu Gln Lys Trp Gly Arg Met Cys Gly Leu Val Met Leu Leu Pro	
710 715 720	
cat ggc tac gaa ggt cag gga ccg gaa cac tcc tct gcc cgt ctg gaa	2532
His Gly Tyr Glu Gly Gln Gly Pro Glu His Ser Ser Ala Arg Leu Glu	
725 730 735	
cgc tat ctg caa ctt tgc gcc gag cag aac atg cag gtt tgc gtc ccg	2580
Arg Tyr Leu Gln Leu Cys Ala Glu Gln Asn Met Gln Val Cys Val Pro	
740 745 750	
tcg acg ccg gct cag gtg tat cac atg ctg cgc cgt cag gcg ctg cgc	2628
Ser Thr Pro Ala Gln Val Tyr His Met Leu Arg Arg Gln Ala Leu Arg	
755 760 765	
ggg atg cgc cgt ccg ctg gtg gtg atg tcg ccg aag tcg ctg tta cgc	2676
Gly Met Arg Arg Pro Leu Val Val Met Ser Pro Lys Ser Leu Leu Arg	

770	775	780	785	
cat cca ctg gcg atc tcg tcg ctg gat gaa ctg gca aac ggc agt ttc	2724			
His Pro Leu Ala Ile Ser Ser Leu Asp Glu Leu Ala Asn Gly Ser Phe				
790	795	800		
cag ccg gcc att ggt gag atc gac gat ctg gat ccg cag ggc gtg aaa	2772			
Gln Pro Ala Ile Gly Glu Ile Asp Asp Leu Asp Pro Gln Gly Val Lys				
805	810	815		
cgc gtc gtg ctg tgc tcc ggt aag gtt tac tac gat ctg ctg gaa cag	2820			
Arg Val Val Leu Cys Ser Gly Lys Val Tyr Tyr Asp Leu Leu Glu Gln				
820	825	830		
cgt cgt aaa gac gag aaa acc gat gtt gcc atc gtg cgc atc gaa cag	2868			
Arg Arg Lys Asp Glu Lys Thr Asp Val Ala Ile Val Arg Ile Glu Gln				
835	840	845		
ctt tac ccg ttc ccg cat cag gcg gta cag gaa gca ttg aaa gcc tat	2916			
Leu Tyr Pro Phe Pro His Gln Ala Val Gln Glu Ala Leu Lys Ala Tyr				
850	855	860	865	
tct cac gta cag gac ttt gtc tgg tgc cag gaa gag cct ctg aac cag	2964			
Ser His Val Gln Asp Phe Val Trp Cys Gln Glu Glu Pro Leu Asn Gln				
870	875	880		
ggc gcc tgg tac tgt agc cag cat cat ttc cgt gat gtc gtg ccg ttt	3012			
Gly Ala Trp Tyr Cys Ser Gln His His Phe Arg Asp Val Val Pro Phe				
885	890	895		
ggt gcc acc ctg cgt tat gca ggt cgc ccg gca tcg gct tct ccg gcc	3060			
Gly Ala Thr Leu Arg Tyr Ala Gly Arg Pro Ala Ser Ala Ser Pro Ala				
900	905	910		
gtg ggt tat atg tcc gta cac caa caa cag cag caa gac ctg gtt aat	3108			
Val Gly Tyr Met Ser Val His Gln Gln Gln Gln Gln Asp Leu Val Asn				
915	920	925		
gac gca ctg aac gtc aat taattaaag gaaagata atg agt agc gta gat	3159			

Asp Ala Leu Asn Val Asn	Met Ser Ser Val Asp
930	935 1 5
att ctc gtt ccc gac ctg cct gaa tcg gtt gca gat gcc aca gta gca	3207
Ile Leu Val Pro Asp Leu Pro Glu Ser Val Ala Asp Ala Thr Val Ala	
10 15 20	
acc tgg cac aag aaa cca ggc gat gca gtc agc cgc gat gaa gtc atc	3255
Thr Trp His Lys Lys Pro Gly Asp Ala Val Ser Arg Asp Glu Val Ile	
25 30 35	
gtc gaa att gaa act gac aaa gtc gtg ctg gaa gtg ccg gca tct gcc	3303
Val Glu Ile Glu Thr Asp Lys Val Val Leu Glu Val Pro Ala Ser Ala	
40 45 50	
gat ggc gtg ctg gaa gcc gtg ctg gaa gac gaa ggg gca acc gtt acg	3351
Asp Gly Val Leu Glu Ala Val Leu Glu Asp Glu Gly Ala Thr Val Thr	
55 60 65	
tcc cgc cag atc ctg ggt cgc ctg aaa gaa ggc aac agt gcg ggt aaa	3399
Ser Arg Gln Ile Leu Gly Arg Leu Lys Glu Gly Asn Ser Ala Gly Lys	
70 75 80 85	
gaa agc agt gcc aaa gcg gaa agc aat gac acc acg cca gcc cag cgt	3447
Glu Ser Ser Ala Lys Ala Glu Ser Asn Asp Thr Thr Pro Ala Gln Arg	
90 95 100	
cag aca gcg tcg ctt gaa gaa gag agc agc gat gcg ctc agc ccg gcg	3495
Gln Thr Ala Ser Leu Glu Glu Glu Ser Ser Asp Ala Leu Ser Pro Ala	
105 110 115	
atc cgt cgc ctg att gcg gag cat aat ctt gac gct gcg cag atc aaa	3543
Ile Arg Arg Leu Ile Ala Glu His Asn Leu Asp Ala Ala Gln Ile Lys	
120 125 130	
ggc acc ggc gta ggc gga cgt tta acg cgt gaa gac gtt gaa aaa cat	3591
Gly Thr Gly Val Gly Gly Arg Leu Thr Arg Glu Asp Val Glu Lys His	
135 140 145	

ctg gcg aac aaa ccg cag gct gag aaa gcc gcc gcg cca gcg gcg ggt	3639
Leu Ala Asn Lys Pro Gln Ala Glu Lys Ala Ala Ala Pro Ala Ala Gly	
150 155 160 165	
gca gca acg gct cag cag cct gtt gcc aac cgc agc gaa aaa cgt gtt	3687
Ala Ala Thr Ala Gln Gln Pro Val Ala Asn Arg Ser Glu Lys Arg Val	
170 175 180	
ccg atg acg cgt tta cgt aag cgc gtc gcg gag cgt ctg ctg gaa gcc	3735
Pro Met Thr Arg Leu Arg Lys Arg Val Ala Glu Arg Leu Leu Glu Ala	
185 190 195	
aag aac agc acc gcc atg ttg acg acc ttc aac gaa atc aac atg aag	3783
Lys Asn Ser Thr Ala Met Leu Thr Thr Phe Asn Glu Ile Asn Met Lys	
200 205 210	
ccg att atg gat ctg cgt aag cag tac ggc gat gcg ttc gag aag cgt	3831
Pro Ile Met Asp Leu Arg Lys Gln Tyr Gly Asp Ala Phe Glu Lys Arg	
215 220 225	
cac ggt gtg cgt ctg ggc ttt atg tct ttc tac atc aag gcc gtg gtc	3879
His Gly Val Arg Leu Gly Phe Met Ser Phe Tyr Ile Lys Ala Val Val	
230 235 240 245	
gaa gcg ctg aag cgt tat cca gaa gtc aac gcc tct atc gat ggc gaa	3927
Glu Ala Leu Lys Arg Tyr Pro Glu Val Asn Ala Ser Ile Asp Gly Glu	
250 255 260	
gac gtg gtg tac cac aac tat ttc gat gtg agt att gcc gtc tct acg	3975
Asp Val Val Tyr His Asn Tyr Phe Asp Val Ser Ile Ala Val Ser Thr	
265 270 275	
cca cgc gga ctg gtg acg cct gtc ctg cgt gac gtt gat gcg ctg agc	4023
Pro Arg Gly Leu Val Thr Pro Val Leu Arg Asp Val Asp Ala Leu Ser	
280 285 290	
atg gct gac atc gag aag aaa att aaa gaa ctg gca gtg aaa ggc cgt	4071
Met Ala Asp Ile Glu Lys Lys Ile Lys Glu Leu Ala Val Lys Gly Arg	

295	300	305	
gac ggc aag ctg acg gtt gac gat ctg acg ggc ggt aac ttt acc atc			4119
Asp Gly Lys Leu Thr Val Asp Asp Leu Thr Gly Gly Asn Phe Thr Ile			
310	315	320	325
acc aac ggt ggt gtg ttc ggt tcg ctg atg tct acg cca atc atc aac			4167
Thr Asn Gly Gly Val Phe Gly Ser Leu Met Ser Thr Pro Ile Ile Asn			
	330	335	340
ccg cca cag agc gcg att ctg ggc atg cac gcc att aaa gat cgt cct			4215
Pro Pro Gln Ser Ala Ile Leu Gly Met His Ala Ile Lys Asp Arg Pro			
	345	350	355
atg gcg gtc aat ggt cag gtt gtg atc ctg cca atg atg tac ctg gct			4263
Met Ala Val Asn Gly Gln Val Val Ile Leu Pro Met Met Tyr Leu Ala			
	360	365	370
ctc tcc tac gat cac cgt tta atc gat ggt cgt gaa tct gtc ggc tat			4311
Leu Ser Tyr Asp His Arg Leu Ile Asp Gly Arg Glu Ser Val Gly Tyr			
	375	380	385
ctg gtc gcg gtg aaa gag atg ctg gaa gat ccg gcg cgt ctg ctg ctg			4359
Leu Val Ala Val Lys Glu Met Leu Glu Asp Pro Ala Arg Leu Leu Leu			
390	395	400	405
gat gtc tgattcatca ctgggcacgc gttgcgtgcc caatctcaat actcttttca			4415
Asp Val			
gatctgaatg gatagaacat c atg aac tta cac gaa tac cag gct aaa cag			4466
Met Asn Leu His Glu Tyr Gln Ala Lys Gln			
	1	5	10
ctg ttt gca cgg tat ggc atg cca gca ccg acc ggc tac gcc tgt act			4514
Leu Phe Ala Arg Tyr Gly Met Pr Ala Pro Thr Gly Tyr Ala Cys Thr			
	15	20	25
aca cca cgt gaa gca gaa gaa gcg gca tcg aaa atc ggt gca			4556

Thr Pro Arg Glu Ala Glu Glu Ala Ala Ser Lys Ile Gly Ala

30

35

40

【 0 0 7 8 】

<210> 2

<211> 39

<212> PRT

<213> Enterobacter agglomerans

<400> 2

Ala Phe Ser Val Phe Arg Cys His Ser Ile Met Asn Cys Val Ser Val

1

5

10

15

Cys Pro Lys Gly Leu Asn Pro Thr Arg Ala Ile Gly His Ile Lys Ser

20

25

30

Met Leu Leu Gln Arg Ser Ala

35

【 0 0 7 9 】

<210> 3

<211> 935

<212> PRT

<213> Enterobacter agglomerans

<400> 3

Met Gln Asn Ser Ala Met Lys Pro Trp Leu Asp Ser Ser Trp Leu Ala

1

5

10

15

Gly Ala Asn Gln Ser Tyr Ile Glu Gln Leu Tyr Glu Asp Phe Leu Thr

20

25

30

Asp Pro Asp Ser Val Asp Ala Val Trp Arg Ser Met Phe Gln Gln Leu

35

40

45

Pro Gly Thr Gly Val Lys Pro Glu Gln Phe His Ser Ala Thr Arg Glu

50

55

60

Tyr Phe Arg Arg Leu Ala Lys Asp Ala Ser Arg Tyr Thr Ser Ser Val

65	70	75	80
Thr Asp Pr	Ala Thr Asn Ser Lys Gln Val	Lys Val Leu Gln Leu Ile	
	85	90	95
Asn Ala Phe Arg Phe Arg Gly His Gln Glu Ala Asn Leu Asp Pro Leu			
100	105	110	
Gly Leu Trp Lys Gln Asp Arg Val Ala Asp Leu Asp Pro Ala Phe His			
115	120	125	
Asp Leu Thr Asp Ala Asp Phe Gln Glu Ser Phe Asn Val Gly Ser Phe			
130	135	140	
Ala Ile Gly Lys Glu Thr Met Lys Leu Ala Asp Leu Phe Asp Ala Leu			
145	150	155	160
Lys Gln Thr Tyr Cys Gly Ser Ile Gly Ala Glu Tyr Met His Ile Asn			
165	170	175	
Asn Thr Glu Glu Lys Arg Trp Ile Gln Gln Arg Ile Glu Ser Gly Ala			
180	185	190	
Ser Gln Thr Ser Phe Ser Gly Glu Glu Lys Lys Gly Phe Leu Lys Glu			
195	200	205	
Leu Thr Ala Ala Glu Gly Leu Glu Lys Tyr Leu Gly Ala Lys Phe Pro			
210	215	220	
Gly Ala Lys Arg Phe Ser Leu Glu Gly Gly Asp Ala Leu Val Pro Met			
225	230	235	240
Leu Arg Glu Met Ile Arg His Ala Gly Lys Ser Gly Thr Arg Glu Val			
245	250	255	
Val Leu Gly Met Ala His Arg Gly Arg Leu Asn Val Leu Ile Asn Val			
260	265	270	
Leu Gly Lys Lys Pro Gln Asp Leu Phe Asp Glu Phe Ser Gly Lys His			
275	280	285	
Lys Glu His Leu Gly Thr Gly Asp Val Lys Tyr His Met Gly Phe Ser			
290	295	300	

Ser Asp Ile Glu Thr Glu Gly Gly Leu Val His Leu Ala Leu Ala Phe
 305 310 315 320
 Asn Pro Ser His Leu Glu Ile Val Ser Pro Val Val Met Gly Ser Val
 325 330 335
 Arg Ala Arg Leu Asp Arg Leu Ala Glu Pro Val Ser Asn Lys Val Leu
 340 345 350
 Pro Ile Thr Ile His Gly Asp Ala Ala Val Ile Gly Gln Gly Val Val
 355 360 365
 Gln Glu Thr Leu Asn Met Ser Gln Ala Arg Gly Tyr Glu Val Gly Gly
 370 375 380
 Thr Val Arg Ile Val Ile Asn Asn Gln Val Gly Phe Thr Thr Ser Asn
 385 390 395 400
 Pro Lys Asp Ala Arg Ser Thr Pro Tyr Cys Thr Asp Ile Gly Lys Met
 405 410 415
 Val Leu Ala Pro Ile Phe His Val Asn Ala Asp Asp Pro Glu Ala Val
 420 425 430
 Ala Phe Val Thr Arg Leu Ala Leu Asp Tyr Arg Asn Thr Phe Lys Arg
 435 440 445
 Asp Val Phe Ile Asp Leu Val Cys Tyr Arg Arg His Gly His Asn Glu
 450 455 460
 Ala Asp Glu Pro Ser Ala Thr Gln Pro Leu Met Tyr Gln Lys Ile Lys
 465 470 475 480
 Lys His Pro Thr Pro Arg Lys Ile Tyr Ala Asp Arg Leu Glu Gly Glu
 485 490 495
 Gly Val Ala Ser Gln Glu Asp Ala Thr Glu Met Val Asn Leu Tyr Arg
 500 505 510
 Asp Ala Leu Asp Ala Gly Glu Cys Val Val Pro Glu Trp Arg Pro Met
 515 520 525
 Ser Leu His Ser Phe Thr Trp Ser Pr Tyr Leu Asn His Glu Trp Asp

530	535	540
Glu Pro Tyr Pr	Ala Gln Val Asp Met Lys Arg Leu Lys Glu Leu Ala	
545	550	555
Leu Arg Ile Ser	Gln Val Pro Glu Gln Ile Glu Val Gln Ser Arg Val	
565	570	575
Ala Lys Ile Tyr Asn Asp Arg Lys Leu Met Ala Glu Gly Glu Lys Ala		
580	585	590
Phe Asp Trp Gly Gly Ala Glu Asn Leu Ala Tyr Ala Thr Leu Val Asp		
595	600	605
Glu Gly Ile Pro Val Arg Leu Ser Gly Glu Asp Ser Gly Arg Gly Thr		
610	615	620
Phe Phe His Arg His Ala Val Val His Asn Gln Ala Asn Gly Ser Thr		
625	630	635
Tyr Thr Pro Leu His His Ile His Asn Ser Gln Gly Glu Phe Lys Val		
645	650	655
Trp Asp Ser Val Leu Ser Glu Glu Ala Val Leu Ala Phe Glu Tyr Gly		
660	665	670
Tyr Ala Thr Ala Glu Pro Arg Val Leu Thr Ile Trp Glu Ala Gln Phe		
675	680	685
Gly Asp Phe Ala Asn Gly Ala Gln Val Val Ile Asp Gln Phe Ile Ser		
690	695	700
Ser Gly Glu Gln Lys Trp Gly Arg Met Cys Gly Leu Val Met Leu Leu		
705	710	715
Pro His Gly Tyr Glu Gly Gln Gly Pro Glu His Ser Ser Ala Arg Leu		
725	730	735
Glu Arg Tyr Leu Gln Leu Cys Ala Glu Gln Asn Met Gln Val Cys Val		
740	745	750
Pro Ser Thr Pro Ala Gln Val Tyr His Met Leu Arg Arg Gln Ala Leu		
755	760	765

Arg Gly Met Arg Arg Pro Leu Val Val Met Ser Pro Lys Ser Leu Leu
770 775 780

Arg His Pro Leu Ala Ile Ser Ser Leu Asp Glu Leu Ala Asn Gly Ser
785 790 795 800

Phe Gln Pro Ala Ile Gly Glu Ile Asp Asp Leu Asp Pro Gln Gly Val
805 810 815

Lys Arg Val Val Leu Cys Ser Gly Lys Val Tyr Tyr Asp Leu Leu Glu
820 825 830

Gln Arg Arg Lys Asp Glu Lys Thr Asp Val Ala Ile Val Arg Ile Glu
835 840 845

Gln Leu Tyr Pro Phe Pro His Gln Ala Val Gln Glu Ala Leu Lys Ala
850 855 860

Tyr Ser His Val Gln Asp Phe Val Trp Cys Gln Glu Glu Pro Leu Asn
865 870 875 880

Gln Gly Ala Trp Tyr Cys Ser Gln His His Phe Arg Asp Val Val Pro
885 890 895

Phe Gly Ala Thr Leu Arg Tyr Ala Gly Arg Pro Ala Ser Ala Ser Pro
900 905 910

Ala Val Gly Tyr Met Ser Val His Gln Gln Gln Gln Gln Asp Leu Val
915 920 925

Asn Asp Ala Leu Asn Val Asn
930 935

【0 0 8 0】

<210> 4

<211> 407

<212> PRT

<213> Enterobacter agglomerans

<400> 4

Met Ser Ser Val Asp Ile Leu Val Pro Asp Leu Pro Glu Ser Val Ala

特平 1 1 - 2 3 4 8 0 6

1	5	10	15
Asp	Ala	Thr	Val
Ala	Thr	Trp	His
Lys	Lys	Pro	Gly
Asp	Ala	Val	Ser
20	25	30	
Arg	Asp	Glu	Val
Ile	Val	Glu	Ile
Glu	Thr	Asp	Lys
Val	Val	Leu	Glu
35	40	45	
Val	Pro	Ala	Ser
Ala	Asp	Gly	Val
Leu	Glu	Ala	Val
Leu	Glu	Asp	Glu
50	55	60	
Gly	Ala	Thr	Val
Thr	Ser	Arg	Gln
Ile	Leu	Gly	Arg
Leu	Lys	Glu	Gly
65	70	75	80
Asn	Ser	Ala	Gly
Lys	Glu	Ser	Ser
Ala	Lys	Ala	Glu
Ser	Asn	Asp	Thr
85	90	95	
Thr	Pro	Ala	Gln
Arg	Gln	Thr	Ala
Ser	Leu	Glu	Glu
Glu	Glu	Ser	Ser
Asp			
100	105	110	
Ala	Leu	Ser	Pro
Ala	Ile	Arg	Arg
Leu	Ile	Ala	Glu
His	Asn	Leu	Asp
115	120	125	
Ala	Ala	Gln	Ile
Lys	Gly	Thr	Gly
Val	Gly	Gly	Arg
Leu	Thr	Arg	Glu
130	135	140	
Asp	Val	Glu	Lys
His	Leu	Ala	Asn
Lys	Pro	Gln	Ala
Glu	Lys	Ala	Ala
145	150	155	160
Ala	Pro	Ala	Ala
Gly	Ala	Ala	Thr
Ala	Gln	Gln	Pro
Val	Ala	Asn	Arg
165	170	175	
Ser	Glu	Lys	Arg
Val	Pro	Met	Thr
Arg	Leu	Arg	Lys
Arg	Val	Ala	Glu
180	185	190	
Arg	Leu	Leu	Glu
Ala	Lys	Asn	Ser
Thr	Ala	Met	Leu
Thr	Thr	Phe	Asn
195	200	205	
Glu	Ile	Asn	Met
Lys	Pro	Ile	Met
Asp	Leu	Arg	Lys
Gln	Tyr	Gly	Asp
210	215	220	
Ala	Phe	Glu	Lys
Arg	His	Gly	Val
Arg	Leu	Gly	Phe
Met	Ser	Phe	Tyr
225	230	235	240

Ile Lys Ala Val Val Glu Ala Leu Lys Arg Tyr Pro Glu Val Asn Ala
245 250 255

Ser Ile Asp Gly Glu Asp Val Val Tyr His Asn Tyr Phe Asp Val Ser
260 265 270

Ile Ala Val Ser Thr Pro Arg Gly Leu Val Thr Pro Val Leu Arg Asp
275 280 285

Val Asp Ala Leu Ser Met Ala Asp Ile Glu Lys Lys Ile Lys Glu Leu
290 295 300

Ala Val Lys Gly Arg Asp Gly Lys Leu Thr Val Asp Asp Leu Thr Gly
305 310 315 320

Gly Asn Phe Thr Ile Thr Asn Gly Gly Val Phe Gly Ser Leu Met Ser
325 330 335

Thr Pro Ile Ile Asn Pro Pro Gln Ser Ala Ile Leu Gly Met His Ala
340 345 350

Ile Lys Asp Arg Pro Met Ala Val Asn Gly Gln Val Val Ile Leu Pro
355 360 365

Met Met Tyr Leu Ala Leu Ser Tyr Asp His Arg Leu Ile Asp Gly Arg
370 375 380

Glu Ser Val Gly Tyr Leu Val Ala Val Lys Glu Met Leu Glu Asp Pro
385 390 395 400

Ala Arg Leu Leu Leu Asp Val
405

【 0 0 8 1 】

<210> 5

<211> 40

<212> PRT

<213> Enterobacter agglomerans

<400> 5

Met Asn Leu His Glu Tyr Gln Ala Lys Gln Leu Phe Ala Arg Tyr Gly

1	5	10	15
Met Pro Ala Pr	Thr Gly Tyr Ala Cys Thr Thr Pr	Arg Glu Ala Glu	
	20	25	30
Glu Ala Ala Ser Lys Ile Gly Ala			
35	40		

【 0 0 8 2 】

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 6

gtcgacaata gccygaatct gttctggtcg

30

【 0 0 8 3 】

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 7

aagcttatcg acgctcccct ccccaccgtt

30

【図面の簡単な説明】

【図 1】 p TWVEK 1 0 1 のエンテロバクター・アグロメランス由来 DNA 断片の制限酵素地図。

【図 2】 エンテロバクター・アグロメランス由来の sucA 遺伝子の塩基配列から予想されるアミノ酸配列と、エシェリヒア・コリ由来のものとの比較を示す図。上段：エンテロバクター・アグロメランス、下段：エシェリヒア・コリ

(以下、同様)。

【図 3】 エンテロバクター・アグロメランス由来の *s u c B* 遺伝子の塩基配列から予想されるアミノ酸配列と、エシェリヒア・コリ由来のものとの比較を示す図。

【図 4】 エンテロバクター・アグロメランス由来の *s d h B* 遺伝子の塩基配列から予想されるアミノ酸配列と、エシェリヒア・コリ由来のものとの比較を示す図。

【図 5】 エンテロバクター・アグロメランス由来の *s u c C* 遺伝子の塩基配列から予想されるアミノ酸配列と、エシェリヒア・コリ由来のものとの比較を示す図。

【図 6】 *g l t A* 遺伝子、*p p c* 遺伝子および *g d h A* 遺伝子を有するプラスミド *p M W C P G* の構築を示す図。

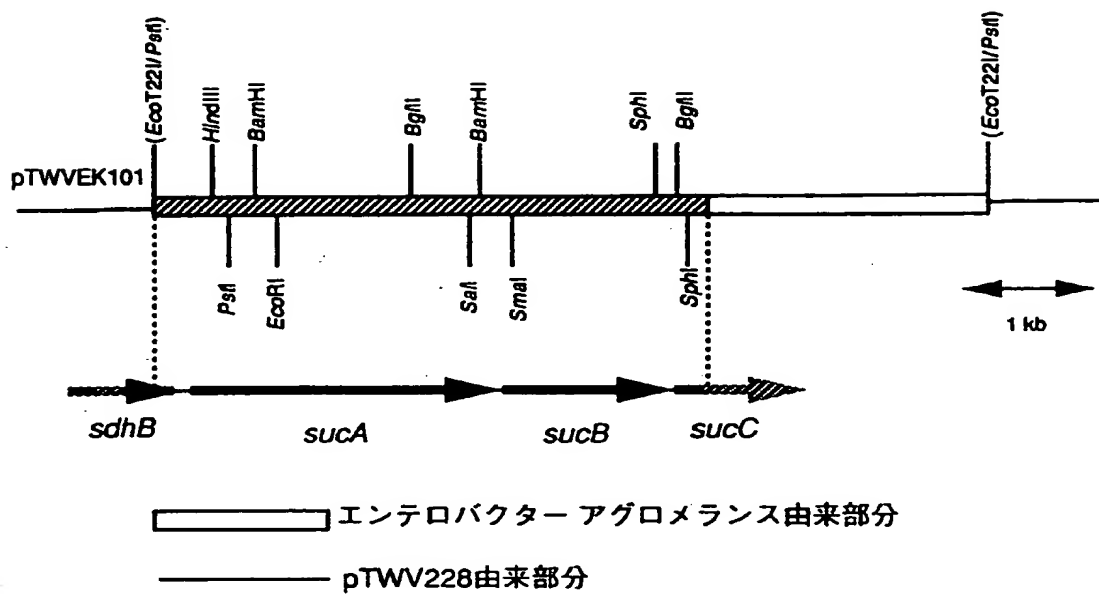
【図 7】 広宿主域プラスミド *R S F 1 0 1 0* の複製起点とテトラサイクリン耐性遺伝子を含むプラスミド *R S F - T e t* の構築を示す図である。

【図 8】 広宿主域プラスミド *R S F 1 0 1 0* の複製起点、テトラサイクリン耐性遺伝子、*g l t A* 遺伝子、*p p c* 遺伝子および *g d h A* 遺伝子を有するプラスミド *R S F C P G* の構築を示す図。

【図 9】 *g l t A* 遺伝子を有するプラスミド *p S T V C B* の構築を示す図。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】

[88.0% / 935 aa]

```

1'  MQNSAMKPWLDSSWLAGANQSYIEQLYEDFLTDPDSVDAVRRSMFQQLPGTGKPEQFHS
.....
1"  MQNSALKAWLDSSYLSGANQSWIEQLYEDFLTDPDSVDAMRRSTFQQLPGTGKPDQFHS
.....
61'  ATREYFRRLAKDASRYTSSVTDPATNSKQVKVLQLINAFRRGHQEANLDPLGLWKQDRV
.....
61"  QTREYFRRLAKDASRYSTISDPDTHVKQVKVLQLINAYRRGHQHANLDPLGLWQDKV
.....
121'  ADLDPAFHDLTDADFQESFNVGSFAIGKETMKLADLFDALKQTYCGSIGAEYMHINTEE
.....
121"  ADLDPSFHDLTEADFQETFNVGSFASGKETMKLGELLEALKQTYCGPIGAEYMHITSTEE
.....
181'  KRWIQQRIESGASQTSFSGEEKKGFLKELTAAEGLEKYLGAKEGAKRFSLEGGDALVPM
.....
181"  KRWIQQRIESG--RATFNSEKKRFLSELTAAGLERYLGAKFPGAKRFSLEGGDALIPM
.....
241'  LREMIRHAGKSGTREVVLGMAHRGRLNVLINVLGKKPQDLDEFSGKHKEHLGTGDVKYH
.....
239"  LKEMIRHAGKSGTREVVLGMAHRGRLNVLVNVLGKKPQDLDEFAGKHKEHLGTGDVKYH
.....
301'  MGFSSDIETEGGLVHLALAFNPISHLEIVSPVVMGSVRARLDRLAEPVSNKVLPTIHGDA
.....
299"  MGFSSDFQTDGGLVHLALAFNPISHLEIVSPVVGSVRARLDRLEPSSNKVLPTIHGDA
.....
361'  AVIGQGVVQETLNMSQARGYEVGGTVRIVINNQGFTTSPKDPARSTPYCTDIGKMWLAP
.....
359"  AVTGQGVVQETLNMSKARGYEVGGTVRIVINNQGFTTSPNLPARSTPYCTDIGKMWQAP
.....
421'  IFHVNADDPEAVAFVTRLALDYRNTFKRDVFIDLVCYRRHGHNEADEPSATQPLMYQKIK
.....
419"  IFHVNADDPEAVAFVTRLALDFRNTFKRDVFIDLVSYRRHGHNEADEPSATQPLMYQKIK
.....
481'  KHPTPRKIYADRLEGEVASQEDATEMVNLYRDALDAGECVVPEWRPMSLHSFTWSPYLN
.....
479"  KHPTPRKIYADKLEQEKVATLEDATEMVNLYRDALDAGDCVVAEWRPMNMHSFTWSPYLN
.....
541'  HEWDEPYPAQVDMKRLKELALRISQVPEQIEVQSRVAKIYNDRKLMAEGEKAQFOWGAEN
.....
539"  HEWDEEYPNKVEMKRLQELAKRISTVPEAVEMQSRVAKIYGDRQAMAAGEKLFOWGAEN
.....
601'  LAYATLVDEGIPVRLSGEDSGRGTFFHRHAVVHNQANGSTYTPLHHIHNSQGEFKWWSV
.....
599"  LAYATLVDEGIPVRLSGEDSGRGTFFHRHAVIHNSNGSTYTPLQIHNGQGAFRWWSV
.....
661'  LSEEAVLAFEYGYATAEPRVLT IWEAQFGDFANGAQVVIDQFISSGEQKWGRMCLVMLL
.....
659"  LSEEAVLAFEYGYATAEPRVLT IWEAQFGDFANGAQVVIDQFISSGEQKWGRMCLVMLL
.....
721'  PHGYEGQGPEHSSARLERYLQLCAEQNMQVCVPSTPAQVYHMLRRQALRGMRRLVVMSP
.....
719"  PHGYEGQGPEHSSARLERYLQLCAEQNMQVCVPSTPAQVYHMLRRQALRGMRRLVVMSP
.....
781'  KSLLRHPLAIISSLELANGSFQPAIGEIDLDLPQGVKRVVLCSGKVYYDLLEQRRKDEKT
.....
779"  KSLLRHPLAVSSLELANGTFLPAIGEIDLDLPKGVKRVVMCSGKVYYDLLEQRRKNNQH
.....
841'  DVAIVRIEQLYPFHQAVQEALKAYSHVQDFVWCQEEPLNQGAWYCSQHHRFQVVPFGAT
.....
839"  DVAIVRIEQLYPFHQAVQEALKAYSHVQDFVWCQEEPLNQGAWYCSQHHRFQVVPFGAT
.....
901'  LRYAGRPASASPAVGYSVHQQQQDLVNDALNVN
.....
899"  LRYAGRPASASPAVGYSVHQQQQDLVNDALNVE

```

【図 3】

[88.2% / 407 aa]

```

1' MSSVDILVPDLPE$VADATVATWHKKPGDAVSRDEVIVEIETDKVWLEVPASADGVLEAV
.....
1' MSSVDILVPDLPE$VADATVATWHKKPGDAVVRDEVLVEIETDKVWLEVPASADGILDAV

61' LEDEGATVTSRQILGRLKEGNSACKESSAKAESNDTTPAQRQTASLEEESSDALSPAIRR
.....
61' LEDEGTTVTSRQILGRLREGNSAGKETSAKSEEKASTPAQRQQASLEEQNNDALSPAIRR

121' LIAEHNLDAAQIKGTGVGGRLTREDVEKHLANKPQAEKAAAPAGAATAQQPVANRSEKR
.....
121' LLAEHNLDASAIGTGVGGRLTREDVEKHLAKAPAKE--SAPAAAAAPAAPALAAARSEKR

181' VPMTRLRKRAERLLEAKNSTAMLTTFNEINMKPIMDLRKQYGDAFEKRHGVRILGFMSFY
.....
179' VPMTRLRKRAERLLEAKNSTAMLTTFNEVNMKPIMDLRKQYGEAFEKRHGIRLGFMSFY

241' IKAVEALKRYPEVNASIDGEDVYHNYFDVSIIVSTPRGLVTPVLRDVALSMADIEKK
.....
239' VKAVEALKRYPEVNASIDGDDVYHNYFDVSMVSTPRGLVTPVLRDVTLGMAIDIEKK

301' IKELAVKGRDGKLTVDLTGGNFTITNGGVFGSLMSTPIINPPQSAILGMHAIKDRPMAV
.....
299' IKELAVKGRDGKLTVEDLTGGNFTITNGGVFGSLMSTPIINPPQSAILGMHAIKDRPMAV

361' NGQVILPMYALSYDHLIDGRESVGYLVAVKEMLEDPARLLLOV
.....
359' NGQVEILPMYALSYDHLIDGRESVGYLVTIKELLEDPTRLLOV

```

【図 4】

[95.1% / 41 aa]

```

1' MNLHEYQAKQLFARYGMPAPTYACTTPREAEAA$KIGAG
.....
1' MNLHEYQAKQLFARYGLPAPVGYACTTPREAEAA$KIGAGPMVVKQVHAGGRGKAGGV

```

【図 5】

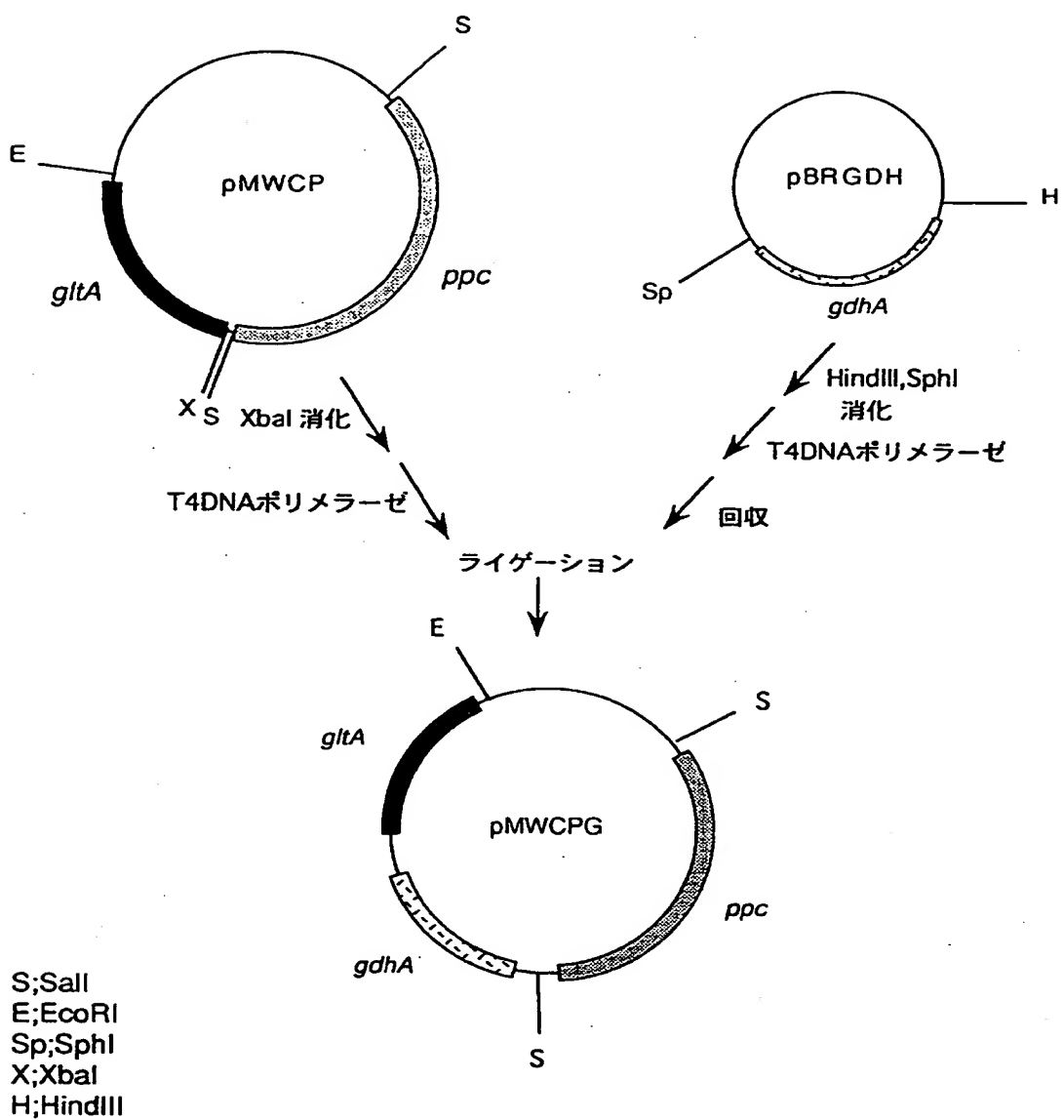
[97.4% / 39 aa]

```

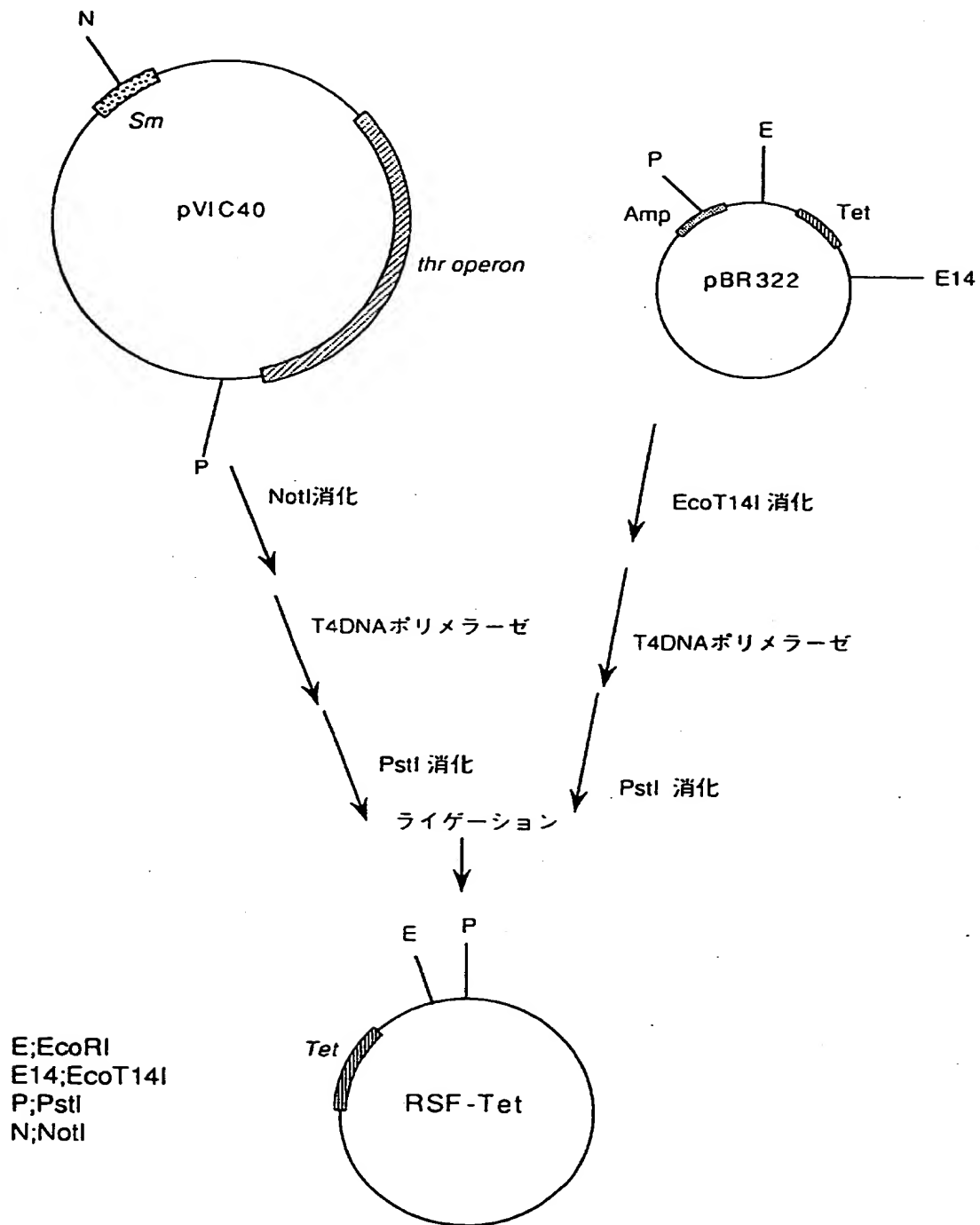
1'
.....AFSVFRCHSIMNCV$VCPKGLNPTRAIGHIKSMLLQRSA
181' FLIDSRDTETDSRLDGLSDAFSVFRCHSIMNCV$VCPKGLNPTRAIGHIKSMLLQRNA

```

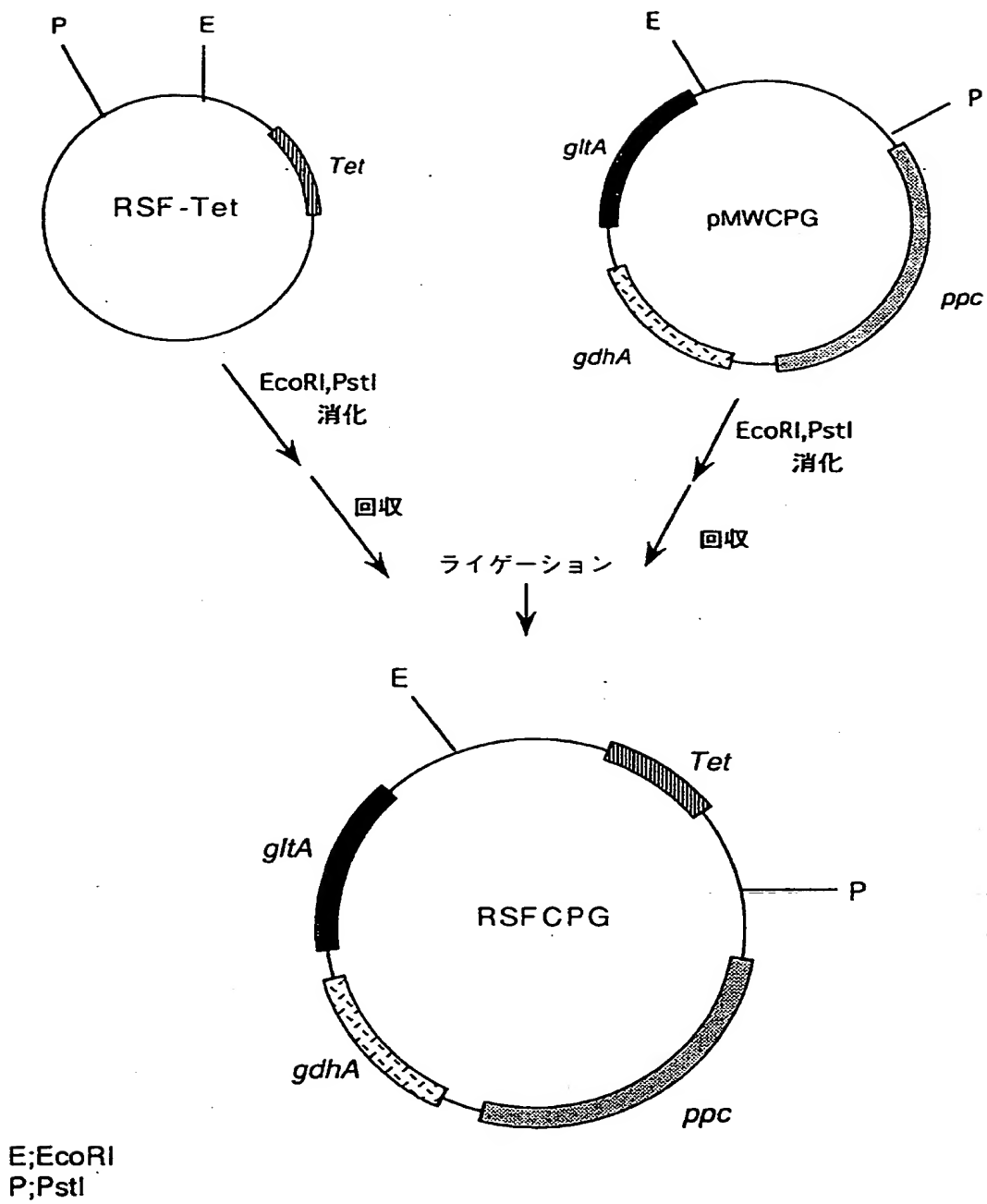
【図 6】



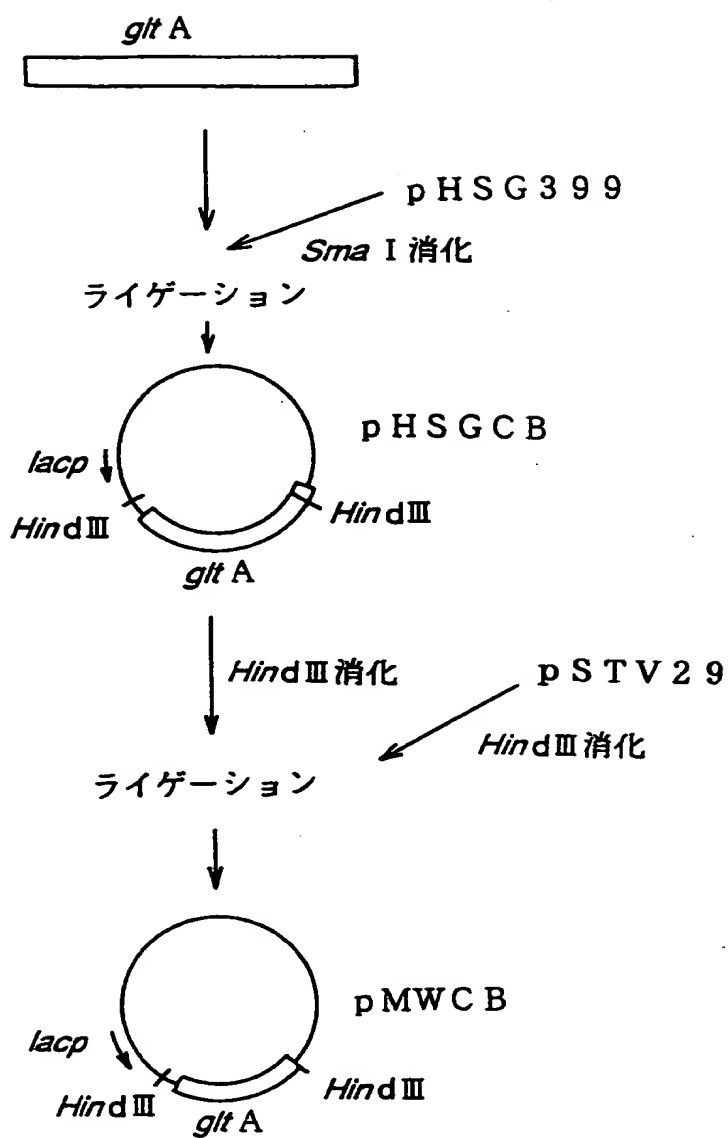
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 低 pH 条件下で L-グルタミン酸を生産する微生物を検索、育種し、得られた微生物を用いて L-グルタミン酸を析出させながら発酵生産する方法を提供すること。

【解決手段】 特定の pH において飽和濃度の L-グルタミン酸を含む液体培地で生育することができ、かつ、前記 pH の液体培地で L-グルタミン酸の飽和濃度を越える量の L-グルタミン酸を培地中に蓄積する能力を有する微生物を、pH が L-グルタミン酸が析出する条件に調整された液体培地に培養し、該培養液中に L-グルタミン酸を析出させながら生成蓄積させることにより、L-グルタミン酸を製造する。

【選択図】 図 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 0 0 6 6]

1. 変更年月日	1 9 9 1 年 7 月 2 日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都中央区京橋 1 丁目 1 5 番 1 号
氏 名	味の素株式会社